

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1924-1925

N° 8

LA CAPSULE
DU
PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÆNDER

CONSIDÉRATIONS SUR LES CAPSULES MICROBIENNES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU

Diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1925

PAR

P. BORIN

Pharmacien
Licencié-ès-sciences
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris
Lauréat de la Faculté
Ancien élève de l'Institut Pasteur
Membre de la Société de Chimie Biologique

JURY { MM. RADAIS, *président*
GRIMBERT, *professeur*
LUTZ, *agréé*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & C^o, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

—
1925

THÈSE

Pour l'Obtention du

Diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O, ✱, O I.
 PERROT, *Assesseur*, O, ✱, O I.
 G. DURSANT, *Secrétaire*, ✱, O, I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, C, ✱, O I.	Botanique Générale.
H. GAUTIER, O, ✱, O I.	Chimie minérale.
RADAIS, O, ✱, O I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C, ✱, O I.	Chimie organique.
PERROT, O, ✱, O I.	Histoire Naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, ✱, O I.	Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut, O I.	Physique.
GRIMBERT, ✱, O I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O, ✱, O I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O, ✱, O I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ✱, O I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, O I.	Chimie analytique.
N.	Pharmacie galénique.

Doyens honoraires : MM. GUIGNARD, C, ✱, O I. et H. GAUTIER, O, ✱, O I.

Professeurs honoraires : M. MOUREU, G. O, ✱, O I. et VILLIERS, ✱, O I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, ✱, O I.	Minéralogie.
MARC HONNORAT, ✱, O I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, O I.	Cryptogamie.
GUÉRIN, ✱, O I.	Botanique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✱, O I.	MM. GUÉRIN, ✱, O I.	MM. LAUNOY, ✱, O A.
DAMIENS, O A.	LUTZ, ✱, O I.	HÉRISSEY, ✱, O I.
TASSILLY, ✱, O I.	GORIS, ✱, O I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ✱, O I.	Chimie générale.
COUSIN, ✱, O I.	Chimie analytique.
SOUÈGES, O I.	Micrographie.
LEROUX, O I.	Physique.
DEVAL, O A.	Microbiologie.
FRANÇOIS, ✱, O I.	Travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BARRAU-DIHIGO, O I.

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1924-1925

N° 8

LA CAPSULE

DU

PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÆNDER

CONSIDÉRATIONS SUR LES CAPSULES MICROBIENNES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU

Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1925

PAR

P. BORIN

Pharmacien
Licencié-ès-sciences
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris
Lauréat de la Faculté
Ancien élève de l'Institut Pasteur
Membre de la Société de Chimie Biologique

JURY

}

MM.

RADAIS,
GRIMBERT,
LUTZ,

*président
professeur
agréé*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1925



A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MON PÈRE

A M. LE PROFESSEUR MAURICE NICOLLE

A M. LE PROFESSEUR MAXIME RADAIS

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris

A M. LE DOCTEUR L. COTONI

Assistant à l'Institut Pasteur

INTRODUCTION

La capsule du pneumobacille de Friedlænder constitue un caractère morphologique très important, dont la mise en évidence semble parfois nécessaire pour affirmer que l'on a affaire à ce germe.

La question de la présence de cette capsule dans les milieux de culture a été l'objet de nombreuses controverses. Le manque d'un bon procédé de coloration ou l'insuffisance des méthodes employées par les divers auteurs, les ont conduit à des conclusions différentes.

Si la plupart sont unanimes à reconnaître la présence de la capsule dans les milieux albumineux (bouillon-sérum, liquide d'ascite) il n'en est pas de même, lorsqu'il s'agit d'un milieu liquide ordinaire, tel que le bouillon Martin, ou d'un milieu solide tel que la gélose. Aussi dans les traités classiques de Bactériologie (Dopter et Sacquépée, Besson, Bezançon, Macé, Flugge, Migula, etc...) nie-t-on la présence de la capsule dans les milieux liquides ordinaires.

Notre travail se compose de quatre parties :

La première partie est une étude approfondie des

conditions dans lesquelles il faut se placer pour observer les capsules microbiennes. Elle nous a conduit à une nouvelle technique basée sur l'emploi de l'encre de Chine, que nous avons appliquée au pneumobacille et à l'étude de divers germes, tels que le pneumocoque, le leuconostoc méésentéroïdes, la bactériidie charbonneuse, etc...

La deuxième partie est consacrée à l'étude chimique de la capsule du pneumobacille de Friedlænder. Elle comprend également l'exposé d'un certain nombre de recherches accessoires sur la capsule de ce germe (décapsulation du pneumobacille, vitalité et virulence du germe décapsulé, etc...)

La troisième partie est une étude générale des travaux antérieurs sur les gommés microbiennes, étude provoquée par les résultats de l'analyse chimique du pneumobacille.

La quatrième partie est une revue de toutes les méthodes employées pour colorer les capsules. Leur nombre pouvait faire présumer de leurs imperfections, et leur étude minutieuse nous a conduit à en éliminer un très grand nombre comme étant entachées d'erreurs. Nous exposons dans cette partie les difficultés que l'on rencontre lorsqu'on veut essayer de colorer la capsule du pneumobacille, et les raisons des insuccès.

Cette étude est bien spéciale au pneumobacille de Friedlænder, car les obstacles rencontrés dans la mise en évidence des capsules sont inhérents à leur nature chimique spéciale. C'est d'ailleurs une raison

des échecs des différents auteurs, de n'avoir pas su concilier la structure chimique de la substance qu'ils cherchaient à colorer avec des divers agents fixateurs ou colorants qu'ils employaient.

Cependant, l'existence de certains points communs à de nombreux germes, relativement à leur capsule, nous a conduit à étendre un peu notre champ d'expérience, et à aborder, d'un point de vue plus général, la question des capsules microbiennes.

Ces recherches ont été effectuées dans le laboratoire de M. le Professeur Maurice Nicolle.

Que ce maître veuille bien nous permettre de lui exprimer ici notre respectueuse reconnaissance pour les directives éclairées, les encouragements qu'il a bien voulu nous prodiguer, et pour l'accueil bienveillant que nous avons reçu dans son laboratoire.

Nous prions également M. le Dr L. Cotoni assistant à l'Institut Pasteur, d'agréer l'expression de nos très vifs remerciements pour les précieux renseignements qu'il nous a fournis au cours de cette étude.

C'est grâce à ses explications judicieuses que nous avons pris un vif intérêt à la science bactériologique.

LA CAPSULE

DU

PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÆNDER

CONSIDÉRATIONS SUR LES CAPSULES MICROBIENNES

CHAPITRE PREMIER

PRÉSENCE DE LA CAPSULE DU PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÆNDER DANS TOUS LES MILIEUX. — NOUVELLE MÉTHODE D'EXAMEN DES CAPSULES MICROBIENNES

Comment définir une capsule microbienne ?

Il est utile au début d'une étude sur la capsule du pneumobacille de Friedlænder, de préciser ce que les bactériologistes entendent par capsules microbiennes, et de voir si cette appellation correspond à un élément différencié, soit par ses affinités colorantes, soit par sa structure chimique spéciale, mise en évidence par l'analyse, ou par des réactions microchimiques, soit par sa morphologie particulière.

Or, une capsule microbienne ne comporte pas de définition précise pour la raison que nos connaissances sur la structure des bactéries sont encore peu étendues,

« En examinant au microscope, dit Macé (1), même à de très forts grossissements, des bactéries bien vivantes, sans faire intervenir aucun réactif, ni prendre de cellules altérées ou trop vieilles, la structure paraît être des plus simples. Les éléments, coccus ou bâtonnets, sont de petits corps hyalins, semblant tout à fait homogènes. Ce n'est qu'avec certaines espèces à éléments de grandes dimensions, qu'un examen direct attentif peut faire constater l'existence de fines granulations à l'intérieur. Pour les autres, quand on y peut distinguer quelques détails, il faut faire intervenir des conditions spéciales, employer des réactifs colorants, modifier l'élément par une action quelconque. Mais aussi, l'on ne peut plus être certain de n'avoir pas changé la véritable structure, que les formes vues ne sont pas des modifications provoquées par les réactifs employés, des aspects en quelque sorte artificiels, même cadavériques. »

Comme toute cellule vivante, il semble *a priori* que les bactéries doivent être constituées par un protoplasme renfermant un noyau (dont l'existence est encore bien controversée) le tout étant contenu dans une membrane d'enveloppe.

Il est nécessaire, comme le fait remarquer Duclaux, d'admettre l'existence de cette membrane (qu'on peut d'ailleurs voir chez la plupart des bactéries) pour expliquer la flexibilité de certains bacilles qui

1. E. Macé, *Traité pratique de bactériologie*, t. I, p. 18, 6^e éd.

se plient et se redressent à la façon d'une tige flexible, et d'autre part, l'aspect en vrilles de certaines espèces qui conservent leurs formes, dans leurs mouvements de progression. Kunstler et Busquet (1) distinguent deux parties dans cette membrane d'enveloppe : une couche interne, mince, qu'ils envisagent comme la vraie membrane (couche cuticulaire) et une couche externe, d'aspect gélatineux, assez mal délimitée (couche gélatineuse).

« Les formations décrites sous le nom de capsules, ne sont qu'une exagération, un grand développement de cette couche gélatineuse. Un assez grand nombre de germes en présentent d'une façon relativement constante dans des conditions déterminées. Parmi les mieux pourvues à ce point de vue, se trouvent le pneumocoque et le pneumobacille de Friedländer. Chez d'autres, il y a une exagération encore plus marquée du même processus qui devient alors une véritable sécrétion de matière gélatineuse, comme chez le *Bacterium pediculatum*, isolé par Koch et Hosaeus (2) d'eaux de sucreries, et le *Bacterium vermiforme*, trouvé par Marshall Ward » (Macé).

Telles sont les principales opinions des bactériologistes concernant la capsule. Mais ceux qui émettent les hypothèses énoncées plus haut n'ont pas vu au microscope la genèse de cette substance. Ils n'ont

1. Kunstler et Busquet, *Observations sur la structure des bactériacées et des organismes voisins*. Bordeaux, 1897.

2. Koch et Hosaeus, *Ueber einen neuen Froschlaich der Zuckerfabriken*. *Cent. f. Bakt.*, t. XVI, 1894.

pas vu la couche gélatineuse se gonfler pour former une capsule et ils n'ont émis leurs idées sur la structure de celle-ci qu'après avoir été avertis de sa présence, par d'autres moyens.

Or, c'est dans des conditions bien spéciales que celle-ci peut être vue, car on ne l'observe pas à l'examen direct ; mais, si on colore par le bleu de méthylène un frottis de sang infecté par le pneumobacille de Friedlænder, ou une sérosité quelconque, on s'aperçoit que chaque bâtonnet central coloré en bleu, est entouré d'une enveloppe légèrement colorée. Or d'autres microbes, le B. typhique, le B. coli, le Proteus, ne donnent pas de telles images dans ces conditions. C'est alors que l'on a appelé « capsule » cette substance qui enveloppe le corps central facilement colorable. Pour la mettre en évidence, la méthode est laissée au choix des chercheurs qui peuvent employer les moyens les plus divers, ce qui ne manque d'ailleurs pas d'en amener plusieurs à voir des capsules un peu partout, grâce à la complaisance de méthodes imparfaites.

C'est ainsi que par divers procédés de coloration ou de fixation, et avec *un matériel bien déterminé* (pus, frottis d'organes, sang, liquide péritonéal) les capsules ont été mises en évidence. Inutile de dire que l'emploi de tels artifices nous interdit absolument de voir dans l'image fixée et colorée la reproduction fidèle de ce qu'elles sont à l'état naturel. Cette image n'est qu'un signe, un indice de leur existence, et tout ce que nous pouvons dire, c'est que l'on

appelle couramment capsule, *la partie la plus externe d'un microbe que l'on puisse mettre en évidence par les moyens dont on dispose et difficile à colorer par les colorants usuels qui teignent, par contre, intensément la zone centrale.*

En ce qui nous concerne plus particulièrement, la question de l'existence d'une capsule autour du pneumobacille de Friedlænder n'est mise en doute par personne. Pour nous en rendre compte, il suffit d'examiner le sang d'une souris ou d'un cobaye mort d'une septicémie à pneumobacille. Le sang étalé sur lame et fixé à l'alcool est coloré, soit avec du bleu de méthylène, soit avec de la fuchsine. L'examen microscopique montre des bâtonnets fortement colorés, et autour d'eux, se trouve une enveloppe très nette mais moins fortement colorée. La même image est obtenue par l'examen du liquide péritonéal ou d'un frottis de rate.

Ensemençons alors une goutte de sang infecté dans 10 centimètres cubes de bouillon Martin, dans 10 centimètres cubes de liquide d'ascite, et sur un tube de gélose. Le lendemain, le bouillon est uniformément troublé et à la partie de sa surface directement en contact avec le tube, il s'est formé une collerette blanchâtre. Prélevons une goutte de la culture, étalons-la sur lame, et après fixation par l'alcool, colorons d'une façon quelconque. Nous voyons bien encore un bâtonnet central fortement coloré, mais l'enveloppe que nous avons vue dans le sang n'existe plus. Par contre, tous les germes semblent

inclus dans un réseau constitué par des filaments faiblement colorés et rayonnant autour des corps microbiens.

L'examen de l'abondante culture obtenue sur la gélose nous donne des images identiques. Au contraire, les frottis provenant des cultures sur liquide d'ascite ou sur sérum, présentent autour des corps microbiens une capsule légèrement colorée, comme dans le frottis de sang.

Tous ces résultats s'obtiennent, quelle que soit la méthode de fixation ou de coloration employée ; aussi ont-ils conduit la plupart des auteurs à conclure que la capsule du pneumobacille de Friedländer n'existe pas dans les milieux ordinaires. Pour la mettre en évidence, il faut s'adresser à un exsudat ou à une culture sur milieu albumineux.

« La plupart des espèces à capsule, dit Macé, ne les présentent que dans des conditions particulières, surtout lorsqu'elles se développent dans l'organisme, ou dans des milieux particuliers, comme le sérum liquide, le lait. »

Dans tous les traités classiques de bactériologie, on recommande d'ensemencer du sérum de lapin pour voir si le microbe possède une capsule, devant l'impossibilité de la mettre en évidence sur les milieux usuels.

Boni (1) dans un travail sur les capsules, après l'emploi d'un mélange fixateur glycéro-albumineux

1. Boni, *Ricerche sulla capsula dei Bacteri* (Giorn. d. Soc. ital. d'igiene, t. XXIII, p. 417, 1901).

et la coloration consécutive au Bleu de Loeffler et à la fuchsine phéniquée, trouve des capsules dans tous les milieux, mais aussi chez tous les microbes.

Hardouin (1) par une variante de la méthode à l'encre de Chine, trouve lui aussi des capsules dans les milieux artificiels. Mais la plupart des auteurs nient leur présence dans de tels milieux.

Chez le pneumobacille, la « capsule existe seulement sur les milieux albumineux ; elle manque sur tous les autres milieux. Grimbert signale pourtant une auréole très nette, même sur gélose et bouillon » (Dopter et Sacquépée) (2).

« Les germes cultivés artificiellement n'ont pas de capsule, mais elle apparaît de nouveau après leur injection dans le corps des animaux » (Crookshank) (3).

« Dans les milieux de cultures, le pneumobacille de Friedlænder perd sa capsule, ... dans les milieux riches en matières albuminoïdes, dans le sérum liquide de lapin, le pneumobacille conserve sa capsule comme dans les milieux vivants » (Bezançon) (4).

« Beaucoup d'espèces pathogènes qui *in vivo* montrent des capsules bien développées (Tétragène, Pn. de Friedlænder, Rhinosclérome, Charbon) n'en montrent plus quand ils sont pris dans des cultures » (Migula) (5).

Comme on le voit les opinions sont très partagées.

1. Hardouin, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 24 févr. 1912. T. LXXII, p. 298.

2. Dopfer et Sacquépée, *Traité de Bactériologie*. Ed. 1921, p. 383.

3. Crookslank, *Manuel pratique de Bactériologie*, Traduction de M Bergeaud, 1886.

4. Bezançon. *Précis de microbiologie clinique*, 1920, p. 411.

5. Migula, *System d. Bakt.*, 1897.

mais à l'heure actuelle, il est de notion courante que le pneumobacille de Friedländer perd sa capsule dans les milieux de culture artificiels.

Or lorsque la présence d'un élément de la cellule est aussi vivement discutée, on conçoit qu'il est logique, pour départager les différentes opinions de faire subir à cet élément le moins d'altération possible du fait de l'emploi des fixateurs tels que le sublimé, le formol, l'alcool, l'alcool-éther ou la chaleur.

Il se peut que ces agents n'aient aucune influence néfaste sur l'intégrité morphologique de la capsule, mais on l'ignore *a priori*, et l'on doit s'entourer de toutes les garanties techniques nécessaires.

Etude des techniques à employer pour mettre la capsule en évidence

Pour éviter l'altération des capsules par l'emploi de fixateurs ou de colorants, nous nous sommes adressés aux trois méthodes suivantes :

- 1° L'examen direct ;
- 2° L'examen sur fond noir ;
- 3° L'examen par frottis à l'encre de Chine.

Les deux premières méthodes sont des méthodes de choix, car il n'est employé aucune substance fixatrice ou colorante.

La deuxième, permet, grâce à un mode d'éclairage spécial, de voir des organismes invisibles par l'emploi de la première.

La troisième présente un petit inconvénient du

fait de la dessiccation préalable du frottis, ce qui ne permet pas l'examen de la capsule à l'état même où elle se trouve dans le bouillon. Nous reviendrons d'ailleurs longuement sur cet inconvénient et sur les moyens de l'éviter.

a) *Examen direct*. — Comme on peut le prévoir, l'examen direct ne donne aucun résultat. Il est si aisé qu'on ne comprendrait pas qu'il y eut des avis aussi partagés sur l'existence de la capsule dans les milieux liquides. L'examen direct ne permet l'observation des objets que si ces derniers ont un indice de réfraction nettement différent de celui du milieu dans lequel ils sont placés.

Dans le cas qui nous occupel l'examen direct montre simplement de petits bâtonnets hyalins plus ou moins allongés et dépourvus de mouvement, sans la moindre enveloppe capsulaire apparente. Mais il est possible (et nous verrons plus loin, qu'il en est ainsi précisément) que la capsule soit formée d'une substance très peu réfringente et que l'examen direct, méthode peu sensible, la laisse inaperçue. Aussi l'imperfection de la méthode nous interdit-elle de conclure.

b) *Examen sur fond noir*. — Dans cette méthode d'examen, on éclaire les objets par des rayons latéraux. Ces objets modifient la marche des rayons en les réfractant et en les diffractant. L'objet paraît alors brillamment éclairé sur le fond noir. Cette méthode est très pratique lorsqu'il s'agit de voir des objets de faible réfringence.

En examinant ainsi entre lame et lamelle, une

goutte d'une culture liquide de pneumobacille, on voit des bâtonnets plus ou moins allongés et dépourvus de mouvement, à bords très brillants, sans qu'il soit possible de déceler autour d'eux la moindre capsule.

Est-il possible de conclure? Non, car le principe même de l'examen sur fond noir repose sur la réfraction et la diffraction des rayons lumineux latéraux par les objets examinés; si la capsule est trop peu réfringente (et ici on peut faire la même objection qu'à la méthode d'examen direct) la réfraction et la diffraction ne pourront se faire, et l'on conclura à tort à l'absence de capsule.

c) *Examen par la méthode classique à l'encre de Chine.* — La diffusion du procédé à l'encre de Chine actuellement employé est dû à Burri (1). Mais il a été conseillé primitivement par Errera (2) pour l'étude des contours des organismes pourvus d'une capsule gélatineuse.

L'encre de Chine est une suspension colloïdale de noir de fumée. Les particules charbonneuses sont excessivement fines et denses et donnent après dessiccation l'impression d'un fond noir uniforme.

Cette méthode est très employée en bactériologie. Gins s'en sert pour démontrer les cils du bacille typhique et de certaines autres bactéries, les capsules de divers germes, etc...

1. R. Burri, *Das Tuscheverfahren*, Jena-Fischer, in-8° de 42 p. 3 pl. 1909.

2. L. Errera, *Sur l'emploi de l'encre de Chine en microscopie* (Bull. de la Soc. Belge de microscopie. t. X, p. 478, 1881).

Voici la technique employée :

1° Prélever l'exsudat séreux ou une goutte de culture à examiner ;

2° Mélanger sur lame une goutte de ce liquide avec une égale quantité d'encre de Chine. Le mélange doit être effectué aussi rapidement et aussi parfaitement que possible ;

3° Etaler en couche mince, soit avec une lamelle, comme pour le sang, soit avec une effilure de verre ou un fil de platine. *Sécher par agitation*, sans chauffer ;

4) Examiner dans une goutte d'huile de cèdre.

De cette façon chaque micro-organisme crée une solution de continuité dans la nappe foncée d'encre de Chine dont les particules ont finement épousé les contours du microbe et celui-ci apparaît plus ou moins blanc suivant sa réfringence. Le contraste avec le fond noir permet ici l'observation de tissus peu réfringents, car le milieu ambiant (contrairement à la méthode d'examen direct) est rendu opaque aux rayons lumineux.

Prenons alors une goutte de culture de pneumobacille de Friedlænder en bouillon Martin et faisons un frottis à l'encre de Chine.

On obtient l'image suivante (fig. 3 A, page 40).

Sur la nappe foncée d'encre de Chine, ressortent très lumineuses de petites masses ovalaires dont le centre est occupé par un fin bâtonnet noir d'épaisseur variable, ou souvent même par des granulations noires très rapprochées au nombre de 2 ou 3, géné-

ralement même 2. La partie centrale non réfringente constitue le corps microbien et la masse réfringente est considérée par tous les auteurs employant cette méthode, comme la capsule. Cette prétendue capsule a une largeur variable suivant les bacilles ; en moyenne 1 à 2 μ .

Critique et modification du procédé à l'encre de Chine

Doit-on conclure, en disant que nous avons là, l'image véritable de la capsule ?

Non, car nous avons montré que l'application de cette technique nécessitait un changement de l'état physique du milieu dans lequel se trouvait le micro-organisme, par suite de la dessiccation de la préparation. Or cette dessiccation peut apporter de graves perturbations à la forme de la capsule.

Pour conclure fermement, il faut faire l'examen *sans dessiccation*.

Or, on ne peut examiner avec l'objectif à immersion le frottis encore humide, car l'huile de cèdre chasserait le liquide aqueux de la préparation.

Nous avons alors essayé l'examen entre lame et lamelle :

Une petite goutte de culture est mélangée avec une petite goutte d'encre de Chine, et l'on pose sur le mélange une lamelle que l'on approche délicatement le plus près de la lame ; puis on examine à l'immersion en diaphragmant convenablement.

L'image que l'on observe est alors différente de ce que nous avons vu précédemment. Il y a bien un corps microbien apparaissant en noir, mais il est entouré d'une bande très réfringente, beaucoup moins large que la capsule de la figure 3 A ; ses dimensions sont quelquefois même réduites à celles d'un fin liseré blanc entourant le corps microbien. De plus, chacune de ces images est entourée d'une auréole, d'un halo grisâtre sans délimitation nette. En résumé : il y a toujours un corps central noir, mais la capsule de la première image a laissé place à une bordure blanche péri-microbienne entourée d'une auréole peu réfringente, à bords non limités.

Quelle est la signification de cette auréole ? Répond elle à la présence d'une substance adhérente au microbe ?

Pour résoudre la question nous avons fait des examens dans les mêmes conditions avec des microbes non capsulés tels que le *Proteus*, le *B. Coli*. Jamais nous n'avons observé de telles images.

Il était difficile de fournir une interprétation de ce halo. On pouvait cependant penser qu'il était l'indice de la présence d'une substance que nous observions mal encore dans les conditions où nous opérons.

C'est alors que nous avons employé une méthode différente et qui consistait à examiner la culture en goutte pendante.

On mélange une goutte de culture et une goutte d'encre de Chine sur une lamelle, puis on renverse

cette lamelle sur une cellule de verre formée par un anneau de verre collé sur une lame. Sur la face supérieure de la lamelle, on dépose une goutte d'huile de cèdre et on examine à l'immersion.

Les images observées ainsi sont différentes suivant que l'on fait l'examen au centre de la goutte ou sur ses bords.

Au centre de la goutte, on voit des corpuscules identiques à ceux que l'on observe par l'examen direct entre lame et lamelle sans encre de Chine : un germe plus ou moins allongé et très rétringent, sans autres particularités. Puis à mesure que l'on se rapproche des bords de la goutte, c'est à dire à mesure que l'épaisseur de la préparation va en diminuant, le halo apparaît de plus en plus net.

Donc, la conclusion qui s'impose est la suivante :

Pour examiner avec le plus de netteté la morphologie de cette substance que nous appellerons pour le moment substance extra-microbienne, il faut avoir une épaisseur de préparation la plus faible possible. D'autre part, nous avons vu plus haut que si l'on fait un frottis à l'encre de Chine selon la méthode classique (ce qui est la seule façon d'avoir une préparation peu épaisse) on se heurte à l'inconvénient de la dessiccation.

Pour y obvier, nous avons employé l'artifice suivant : on fait des frottis à l'encre de Chine *sur lamelle*, et de telle façon que la préparation soit assez chargée en eau. Pour cela il suffit de mélanger sur une lamelle une goutte de culture et une goutte d'encre

de Chine ; avec une seconde lamelle, on étale lentement le frottis (à la façon d'un étalement de sang) sans trop presser les deux lamelles l'une contre l'autre, de façon à obtenir une couche liquide d'une certaine épaisseur. Puis on examine sur la cellule précédemment employée. C'est en somme un examen en « frottis pendant ». Ce dernier est encore très épais, mais il va se dessécher peu à peu par évaporation de son eau et à un moment donné, nous pourrions saisir le stade optimum où le frottis *encore humide sera suffisamment desséché* pour être très mince.

Voici les transformations auxquelles on assiste : Tout d'abord, le champ est rempli de germes ayant le type décrit lors de l'examen en goutte pendante. Ces germes par suite des divers courants liquides et des légères secousses accidentelles transmises à la lamelle sont entraînés dans tous les sens.

Au bout d'un certain temps, variable suivant l'épaisseur de la couche, on voit certains de ces germes se fixer contre la lamelle par suite de l'évaporation d'une certaine quantité d'eau. Et l'on observe alors que dès qu'un germe adhère à la lamelle, le halo prend une forme bien précise, devient d'abord plus lumineux, puis se délimite parfaitement de l'encre de Chine, qui elle, par suite de la concentration en grains de noir de fumée, forme un fond de plus en plus foncé (fig. 2, p. 35). Cette substance extramicrobienne observée dans ces conditions apparaît autour de chaque germe dès l'instant qu'il adhère à

la lamelle. Elle est très polymorphe, tantôt ovalaire, tantôt de forme amiboïde. Nous reviendrons d'ailleurs plus loin sur le polymorphisme de cette substance. Sa limite avec l'encre de Chine n'est marquée par aucune ligne brillante ou sombre.

Continuons notre examen, et pour faciliter la description des transformations subies par le microbe, nous allons désigner par A la substance centrale noire, par B la bordure brillante qui entoure A et par C la substance extra-microbienne que nous venons de voir nettement.

Notre préparation encore humide continue à perdre de l'eau. A un certain moment, les grains de l'encre de Chine se sont entièrement déposés. On voit alors les bords de la substance extra-microbienne C se rétracter, se rapprocher du corps microbien A alors que la portion de la même substance directement en contact avec la partie B du microbe devient de plus en plus réfringente, de plus en plus lumineuse.

Puis avec le temps (la transformation demande en tout une à cinq minutes suivant la quantité d'eau présente) la rétraction devient complète et il ne reste plus qu'un corps microbien A entouré d'une zone très brillante formée de B et d'une autre substance qui s'est accumulée là au fur et à mesure que la substance extra-microbienne se rétractait, ce qui semble faire croire que B a augmenté de volume. La préparation atteint alors un nouvel état d'équilibre représenté par la figure 3 A, figure obtenue par la méthode à l'encre de Chine à l'état sec.

Explications des transformations observées

Que s'est-il passé pendant la dessiccation de la préparation ?

La seule explication possible nous paraît être la suivante :

La substance extra-microbienne semble formée par une dilution dans l'eau d'un produit déterminé (nous verrons dans la deuxième partie que ce produit est du galactane et que la capsule contient environ 8 de galactane et 92 d'eau pour 100) qui communique à cette solution une consistance visqueuse, gélatineuse. Lorsqu'on fait un frottis dans les conditions que nous venons de préciser, c'est-à-dire en « frottis pendant », dès que nous voyons nettement la substance extra-microbienne, le frottis a déjà subi un certain degré de dessiccation. Puis passé le stade optimum d'observation la plus parfaite, nous assistons à la dessiccation de la substance. L'eau s'évapore et la substance contenue en suspension se dépose autour de la partie microbienne B, si bien que la figure 3 A représente une partie centrale non réfringente, et une partie externe très réfringente formée de deux substances :

1° Une substance stable : c'est l'enveloppe B, non modifiée par la dessiccation.

2° Le résidu de l'évaporation de la substance extra-microbienne.

Comment expliquer le halo que l'on observe dans la préparation entre lame et lamelle ?

Il suffit de regarder la figure 1 qui représente schématiquement pour les besoins de la démonstration une coupe de frottis à divers états de dessiccation.

Le noyau central représente le corps microbien,

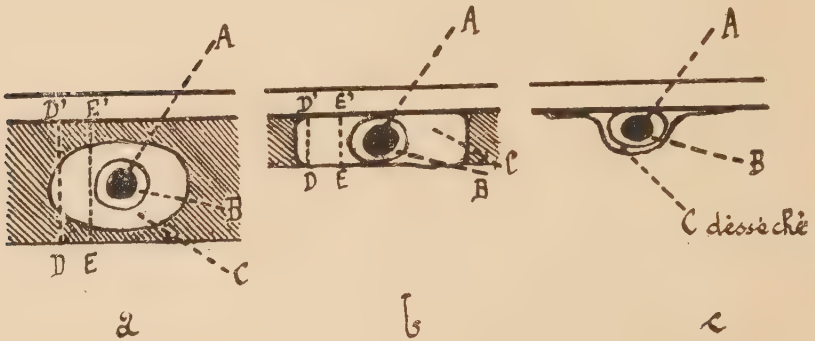


Fig. 1

En a, le microbe encre de Chine (auréole).

En b, il adhère à la lamelle (méthode nouvelle).

En c, la préparation est desséchée (ancienne méthode).

puis viennent successivement l'enveloppe B, et enfin la substance extra-microbienne C.

Dans la figure 1 a, le microbe est libre et se déplace dans le champ. On voit qu'en DD' l'épaisseur d'encre de Chine est plus grande qu'en EE' et cette épaisseur va en augmentant à mesure que l'on s'éloigne du corps microbien pour arriver à la périphérie de la substance C. La quantité de lumière qui parvient à l'objectif, *décroît donc de façon continue*, à mesure que l'on s'éloigne de A, d'où l'explication du halo.

Au contraire la figure 1 b qui représente le moment où l'on voit nettement la substance C, nous montre que du centre du germe, qui vient d'adhérer à la

lamelle, à sa périphérie, l'épaisseur d'encre de Chine à traverser est égale à zéro et qu'ainsi le halo disparaît, laissant place à une image nette et bien limitée.

La figure 1 c, nous montre la préparation desséchée à l'air. L'eau contenue dans la substance extra-microbienne s'est évaporée, et le produit de l'évaporation s'est condensé autour de l'enveloppe B qui semble avoir accru ses dimensions.

Morphologie du pneumobacille de Friedländer examiné par la méthode à l'encre de Chine modifiée.

A l'aide de cette méthode à l'encre de Chine, modifiée en ce sens, que le frottis est observé à un moment d'humidité optimum, on discerne nettement trois parties dans le pneumobacille :

1° Une partie centrale non réfringente, formée, soit d'un bâtonnet de largeur variable (1 μ environ) apparaissant en noir, soit de deux granulations noires comprenant entre elles un espace clair, soit de plusieurs bâtonnets placés bout à bout.

2° Autour de ce bâtonnet, une zone très réfringente de largeur variable, mais généralement étroite.

3° Une substance moins réfringente que la précédente, apparaissant en gris et de grosses dimensions.

Toënniessen (1) qui est un des auteurs ayant le

1. Tënniessen. — *Centr. für Bak. I.*, Orig. T. LXXV, 1915 p. 329, *id. orig.*, T. LXXIII.

mieux étudié la question, faisait des examens en goutte pendante, et la troisième substance lui apparaissait comme un halo ; les reproductions photographiques qu'il donne dans son travail en témoignent. Nous avons montré que ce halo, n'était que l'image imparfaite d'une substance que l'on pouvait voir plus distinctement en laissant se dessécher partiellement la préparation (1).

Ce même auteur dénomme la partie centrale noire : *endoplasme*, ou *corps microbien*, la deuxième partie très réfringente : *ectoplasme*, et la troisième partie *capsule*.

Ces dénominations sont sujettes à caution. Il est indéniable que la substance extra-microbienne C est la vraie capsule. Elle répond bien à la définition que nous avons posée au début de ce chapitre, c'est-à-dire qu'elle est « la partie la plus externe du microbe, que l'on puisse mettre en évidence par la méthode que nous avons employée ».

La partie centrale A doit être appelée corps microbien plutôt qu'endoplasme, ce terme ayant une signification bien précise et semblant faire trop présumer de la nature de ce qu'il veut représenter ici. C'est comme nous le verrons ultérieurement la par-

1. Mentionnons l'examen des cultures dans une suspension de collargol à 1 o/o. Procédé défectueux qui comporte les mêmes critiques que l'emploi de l'encre de Chine en goutte pendante.

« L'examen par cette méthode des germes encapsulés donne de très mauvais résultats, et dans le cas d'une substance périmicrobienne peu développée, il la fait passer complètement inaperçue ». (Baehr et Kantor. *Centr. für Bakt.* Orig. 6 avril 1912).

tie du microbe qui prend facilement les colorants. Sa structure semble être de nature protidique (nucléo-protéide vraisemblablement).

Quant au terme ectoplasme, il est impropre. Tœnniessen prétend trouver entre ses dimensions et le pouvoir agglutinogène des échantillons qu'il étudie des relations de cause à effet qui invitent à la prudence.

Nous voyons plutôt dans cette partie B très réfringente, la membrane cellulaire tout simplement ; et nous émettons cette opinion parce qu'elle est conforme aux théories de Kunstler et Busquet sur la structure des Bactériacées et aux idées de nombreux auteurs parmi lesquels Migula.

Cette membrane est d'une existence indiscutable chez tous les germes comme le fait remarquer Duclaux (voir chap. I, p. 12).

« La membrane cellulaire des Bactéries est une atmosphère relativement dure, située autour du contenu mou protoplasmique ; mais elle semble présenter elle-même une image assez compliquée » (Migula) (1).

Effectivement Kunstler et Busquet distinguent 2 parties dans cette membrane (voir p. 13) une couche interne mince (couche cuticulaire) qu'ils envisagent comme la vraie membrane et une couche externe, d'aspect gélatineux (couche gélatineuse) assez mal délimitée.

1. Migula. *System d. Bakterien*, 1897.

« La membrane cellulaire est plus ou moins bien limitée en dehors et en dedans. La plasmolyse montre qu'elle est nettement tranchée du protoplasme. La limite externe est la moins bien limitée. On pense généralement que le bord externe de la membrane se continue en une atmosphère mince, *comme si la couche externe de la membrane se gonflait au contact du liquide* » (Migula).

Or, la partie B de nos figures correspond bien aux descriptions qui précèdent. Par la dessiccation de la préparation, elle n'est pas altérée, ce qui fait présumer de sa consistance dure. La situation autour du corps microbien est conforme aux données qui précèdent ; sa réfringence particulièrement grande est une des caractéristiques de la membrane.

Enfin la capsule proprement dite, semble bien résulter du gonflement de sa couche gélatineuse comme nous le verrons plus loin.

D'ailleurs les Bactériacées ne sont-elles pas quoique incolores considérées comme faisant partie des Algues Cyanophycées ? Elles voisinent avec les Nostocacées. Or la structure de certaines Algues (*Beggiatoa*, *Gleocapsa*, *Chroococcus*) est parfaitement connue et a été l'objet de nombreuses recherches. Celles-ci ont montré que la cellule de ces Algues est formée d'un protoplasme et d'une membrane cellulaire qui souvent se gonfle en une matière gélatineuse. L'examen était facilité par les dimensions des organismes étudiés.

Or les Algues précitées sont la reproduction en

grand des Bactéries et l'on conçoit qu'il est logique d'employer les mêmes termes pour désigner les parties homologues des deux organismes considérés.

Il nous paraît donc tout à fait inutile de compliquer la terminologie scientifique par l'introduction du mot « ectoplasme » pour désigner ce qui est tout simplement la membrane cellulaire.

Nous nous résumerons donc en disant :

L'examen par la méthode à l'encre de Chine à l'état frais du pneumobacille de Frielænder permet de distinguer trois parties dans sa structure :

- 1° Une partie centrale, ou *corps microbien* ;
- 2° Une *membrane cellulaire* ;
- 3° Une *capsule*.

Technique définitive

La technique à l'encre de Chine à l'état frais telle que nous l'avons décrite, outre qu'elle n'est pas pratique, présente l'inconvénient de ne permettre l'examen de la capsule que pendant un moment relativement court, celui de la dessiccation optimum de la préparation.

Aussi avons-nous cherché un moyen de rendre stables de telles préparations. L'étude de la nouvelle méthode à l'encre de Chine nous a conduit à une technique définitive. Mais le but n'a été atteint qu'après de très nombreux essais, chacun d'eux apportant sa part de lumière. Nous avons finalement abouti à la technique que voici (1) :

1. P. Borin, *Mise en évidence des capsules microbiennes par une nouvelle méthode à l'encre de Chine* (C. R. de la Soc. de Biol., 14 février 1925, t. XCH, p. 406).

Des lames sont lavées au bichromate de potassium et à l'acide sulfurique, soigneusement rincées à l'eau distillée et séchées à l'étuve. On dépose alors sur l'une d'elles une goutte d'un sérum quelconque (sérum humain, sérum de Cheval ou de toute autre espèce animale). Au moyen d'une lamelle on étale en couche mince le sérum, à la façon d'une goutte de sang, et on le dessèche au-dessus d'une veilleuse de bec Bunsen. Lorsque la dessiccation est parfaite, on laisse refroidir. On mélange alors sur la lame une goutte d'encre de Chine (1) à la culture (une goutte de culture liquide ou une goutte d'une émulsion en eau physiologique de culture solide). Avec l'anse de platine (et non avec une lamelle) on étale la préparation sans s'inquiéter de l'irrégularité de l'épaisseur du frottis. Celui-ci étant toujours humide, on inonde le tout avec du xylol. On renverse la lame pour éliminer la plus grande partie de ce liquide et on laisse tomber sur la préparation, d'une hauteur de 1 centimètre environ, une goutte d'huile de cèdre. Puis on porte sur la platine du microscope et on examine à l'immersion, sans interposer de lamelle, mais en ayant soin de ne jamais mettre en contact avec la lame la lentille frontale de l'objectif. Il est nécessaire de diaphragmer. Pour les raisons d'optique exposées plus haut (voir p. 27 et suiv.), il ne faut examiner que les germes fixés contre la lame ; les germes en suspension ne montrent pas de capsules apparentes, mais

1. Les encres de Chine qui conviennent le mieux sont l'encre de Chine R. A. L. et la Pelikan Tusche de Günther-Wagner.

seulement parfois une auréole. Les capsules ainsi fixées et aplaties sur une face par contact apparaissent en gris clair sur le fond noir de la préparation (fig. 2).

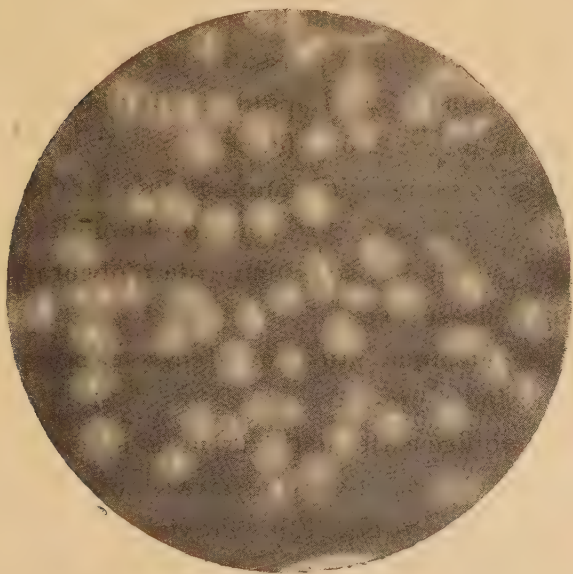


Fig. 2. — Aspect des capsules du pneumobacille de Friedländer (Bouillon Martin) par la méthode à l'encre de Chine à l'état frais (1)

L'explication de notre technique est la suivante : le sérum desséché retient la préparation contre la lame, sinon l'huile de cèdre la chasserait. Sans être indispensable, le xylol offre l'avantage de régulariser l'épaisseur du frottis et de former une couche protectrice empêchant la dessiccation.

Si l'on veut conserver quelque temps des pré-

1. Cette reproduction est due à l'obligeance de M. Jeantet, microphotographe à l'Institut Pasteur.

parations de capsules, on modifie la technique de la façon suivante :

Sur le frottis encore humide on laisse tomber une goutte d'huile de cèdre sans mettre de xylol. On dépose sur la goutte une lamelle qu'on laisse se rapprocher de la lame par le seul effet de la pesanteur. Si on exerçait une pression sur elle, cela dissocierait la préparation. Lorsque la lamelle est bien en place, on lute à la paraffine.

Il faut avoir soin de n'examiner que le centre de la préparation, c'est-à-dire l'endroit immédiatement recouvert par l'huile, sous peine de n'observer que des images desséchées.

Les préparations ainsi montées se conservent une quinzaine de jours.

Ainsi modifiée cette méthode nous a servi à étudier les capsules de divers germes ; nous y reviendrons en temps voulu. Elle convient également à l'examen des humeurs des animaux infectés.

Application de la méthode à l'examen du pneumobacille dans les différents milieux

Nous examinerons tout d'abord les milieux artificiels (*in vitro*), ce qui nous permettra de répondre à la question posée au début du chapitre (les capsules existent-elles dans les milieux non albumineux ?) puis nous étudierons les milieux naturels (*in vivo*).

a) *Bouillon ordinaire*. — La culture de vingt-

quatre heures est uniformément troublée; il se forme une collerette adhérant aux parois du tube, et quelquefois même un voile.

L'examen du liquide par la méthode à l'encre de Chine modifiée nous montre de superbes capsules grisâtres entourant le microbe et sa membrane cellulaire. *Nous avons toujours constaté la présence d'une telle capsule.*

Pour examiner la collerette, il est utile de n'en dissocier qu'une très petite partie dans l'encre de Chine, sous peine d'avoir des préparations trop chargées sur lesquelles on ne peut rien distinguer. En opérant convenablement, on voit un grand nombre de corps microbiens, chacun d'eux étant entouré d'une capsule. Autour de cette capsule, on ne distingue pas de membrane limitante.

b) *Milieux solides.* — Une culture de vingt quatre heures est abondante et douée d'une certaine viscosité. Si le tube est maintenu vertical, la culture coule au fond.

L'examen à l'encre de Chine d'une parcelle de culture convenablement dissociée *montre toujours de très jolies capsules.*

Remarque. — Si nous suivons avec la méthode du frottis pendant décrite plus haut la dessiccation des capsules microbiennes provenant de la gélose ou d'une collerette (bouillon) on observe que les germes étant très rapprochés les uns des autres, la substance capsulaire ne se condense pas uniquement autour de la membrane cellulaire, mais

se dépose aussi sous forme de filaments très fins et enchevêtrés les uns dans les autres. C'est là le réseau que nous avons coloré en partant de la gélose et du bouillon (voir page 15).

Nous comprenons alors pourquoi les auteurs ont méconnu l'existence de la capsule dans les milieux artificiels. A cause de la dessiccation, la capsule était détruite, et ils n'en voyaient que les vestiges sous forme de filaments.

c) *Gélatine*. — Le pneumobacile ensemencé en piqure donne une culture dite « en clou à grosse tête »

L'examen de la culture *montre des capsules*.

d) *Bouillon-sérum, liquide d'ascite*. — Présence de capsules identiques à celles que l'on voit sur bouillon. Nous avons précédemment indiqué que la présence de la capsule dans ces milieux n'avait jamais été contestée.

e) *Sang de souris. Liquide péritonéal*. — L'examen montre la présence de capsules. Notons que dans ces milieux albumineux les capsules ne sont pas plus grosses qu'en bouillon, comme pourrait le faire penser la facilité avec laquelle on les met en évidence par les méthodes de coloration habituelles.

f) *Expectorations*. — La méthode à l'encre de Chine modifiée rend aisé le diagnostic de pneumobacille, grâce à la facilité avec laquelle on met les capsules en évidence.

g) *Frottis d'organes (rate, poumon, foie)*. — On prélève aseptiquement l'organe, et on le sectionne nettement à l'aide de ciseaux stériles ; puis on gratte

légèrement la surface de section avec une anse de platine flambée portant à son extrémité une fine gouttelette d'eau distillée stérile. On mélange avec une goutte d'encre de Chine sur lame recouverte de sérum desséché, et l'opération continue selon la technique décrite.

Polymorphisme de la capsule **Membrane péri-capsulaire**

Lorsque l'on parle de la capsule du pneumobacille de Friedländer comme d'ailleurs de toute capsule microbienne, on se représente une coque pleine entourant le microbe proprement dit, et la description que nous venons de faire de la capsule dans les différents milieux ne peut que fortifier cette conception.

La question a aussi été posée de savoir si la capsule possède une membrane externe. Sans apporter un argument décisif en faveur de la présence ou de l'absence d'une telle membrane, nous allons présenter quelques faits à l'appui de la deuxième hypothèse.

Lorsqu'on examine une colonie âgée de seize heures sur gélose, on observe des germes entourés chacun d'une capsule. Mais abandonnons ce milieu à l'étuve à 37 degrés pendant deux jours, et faisons un nouvel examen. L'aspect observé est complètement différent. On ne voit plus chaque capsule entourant chaque microbe, mais tous sont

englobés dans une masse visqueuse résultant de la fusion de toutes les capsules (voir fig. 3 D). C'est ne véritable plasmode, grisâtre, sur laquelle res-

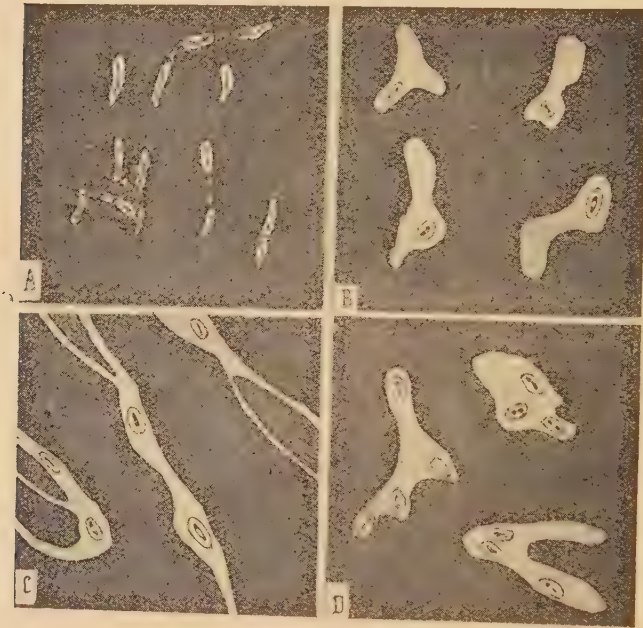


Fig. 3

- A : La capsule par la méthode ordinaire à l'encre de Chine
- B : Formes amiboïdes (méthode à l'encre de Chine modifiée)
- C : Formes en panaches (méthode à l'encre de Chine modifiée)
- D : Formes plasmodiques (méthode à l'encre de Chine modifiée)

sortent les membranes cellulaires brillantes et les corps microbiens noirs. Nous sommes loin ici de la coque gélatineuse entourant chaque microbe, et devant une telle image, il est difficile d'admettre la présence d'une membrane externe.

Examinons maintenant une collerette de culture en bouillon âgée de trois jours environ. A côté de

microbes types, on rencontre fréquemment des figures telles que celles représentées par la figure 3 D ou dans une même capsule de forme non plus ovulaire mais amiboïde, on retrouve plusieurs microbes englobés.

Dans une culture en bouillon Martin vieille de huit jours, si visqueuse, qu'on pouvait retourner le tube sans laisser tomber son contenu, l'examen à l'encre de Chine montrait des aspects tout à fait curieux (fig. 3 C). La substance capsulaire était représentée par de longs panaches traversant la préparation et ressortant en gris sur le fond noir. Les traînées s'anastomosaient par endroits et leur point de fusionnement formait une petite plage dans laquelle étaient englobés les corps microbiens en nombre variable (3, 4, et plus). Dans de telles préparations, il est évident que l'on ne peut plus parler de « capsules » au sens premier du mot, ni de membrane externe, mais seulement de « substance capsulaire » expression qui implique une idée de situation et non pas de forme.

Notons enfin que si nous employons des cultures âgées de trois jours pour montrer le polymorphisme de la capsule, c'est uniquement pour les besoins de la démonstration, car, dans de telles cultures, le nombre des germes est considérable et les formations zoogléliques très abondantes ; mais de telles figures s'observent dans tous les milieux, quoique en moins grand nombre ; ainsi dans une culture en bouillon, on voit fréquemment à côté de capsules

normales de forme ovulaire des capsules déformées.

Signalons pour terminer, une expérience dont les résultats sont contraires à l'hypothèse d'une membrane capsulaire.

Prélevons à partir d'une culture de vingt-quatre heures sur agar, une grosse anse de platine de corps bactériens, et émulsionnons-la dans 20 centimètres cubes d'eau distillée. Puis, après agitation pour obtenir une suspension bien homogène, faisons sur une lame recouverte de sérum desséché un frottis à l'encre de Chine, avec une goutte de cette émulsion. Cette première partie de l'expérience doit être conduite rapidement de manière à ne pas laisser plus de une minute les germes au contact de l'eau. Le frottis étant épais et humide, laissons tomber d'une hauteur de 1 centimètre à 1 cm. 1/2 une grosse goutte d'huile de cèdre. Cette goutte emprisonne une partie du frottis avec une grosse quantité d'eau. Examinons à l'immersion. Sur le moment, on n'observe rien de spécial ; chaque germe est constitué par un corps microbien noir, une membrane cellulaire et une capsule. Examinons de minute en minute pendant un quart d'heure. On voit alors les capsules se mettre à gonfler et prendre des dimensions considérables (allant jusqu'au triple de leur volume primitif) et des formes atypiques. Elles s'étendent inégalement suivant toutes les directions et prennent une forme amiboïde, avec émission de véritables pseudopodes ; puis la préparation se stabilise et l'on n'observe plus aucun changement.

Notre opération a consisté à mettre des capsules au contact d'une grosse quantité d'eau. Les capsules se sont mises à gonfler, en prenant des formes anormales qui n'ont été décrites par aucun des auteurs qui se sont occupés de la question. Nous reviendrons dans le deuxième chapitre sur ce phénomène, et si nous le signalons ici, c'est pour montrer que si l'on veut admettre la *présence d'une membrane péri-capsulaire, il faut au moins la supposer très élastique.

De plus nous avons déjà signalé que les capsules ne présentent à leur périphérie aucune couche différenciable par une consistance ou une réfringence particulière.

Après avoir abandonné pendant trois quarts d'heure la suspension microbienne à la température du laboratoire, en l'agitant de temps en temps, centrifugeons à grande vitesse et faisons un frottis à l'encre de Chine avec le culot de centrifugation.

Sur le fond noir de la préparation, se détachent en blanc les membranes cellulaires présentant à leur partie centrale un petit bâtonnet noir qui est le corps microbien. *Il n'y a plus trace de capsule.* Celle-ci s'est donc dissoute dans l'eau après s'y être gonflée, et voilà un fait qui est encore en contradiction avec l'hypothèse d'une membrane péricapsulaire.

En résumé, l'hypothèse de l'existence d'une telle membrane est contraire aux faits suivants :

1° Le polymorphisme et le fusionnement des capsules observés dans les cultures ;

- 2° Le gonflement considérable de la capsule au contact de l'eau ;
- 3° La dissolution de la capsule dans l'eau ;
- 4° L'absence de caractères optiques pouvant faire supposer sa présence.

Application de la méthode à l'étude de quelques germes « encapsulés »

Ayant à notre disposition, une technique d'exécution facile et respectant rigoureusement les capsules microbiennes, nous avons cherché à les mettre en évidence chez divers germes.

Notre étude a porté sur la bactéridie charbonneuse, sur le *Micrococcus tetragenus*, sur le *Leuconostoc mesenteroides* et, surtout, sur plusieurs races de pneumocoques.

a) *Bactéridie charbonneuse*. — Nous avons examiné une culture de bactéridie charbonneuse de très grande virulence.

Les bâtonnets observés avaient la structure suivante :

Au centre, un corps microbien noir, plus ou moins granuleux. Celui-ci était entouré d'une membrane cellulaire réfringente, et le tout était enfermé dans une gaine hyaline qui était la capsule.

Celle-ci n'est pas altérable comme la capsule du pneumobacille. Mise en contact avec une grosse quantité d'eau, elle ne se gonfle pas, et, si on laisse la préparation se dessécher, elle ne se rétracte pas.

Sa nature est donc complètement différente de celle du pneumobacille (1). La dessiccation n'influençant nullement la capsule, leur examen par la méthode ordinaire les montre inaltérées, et notre technique n'est pas particulièrement indiquée.

b) *Micrococcus tétragenes*. — Il est d'opinion courante que le *micrococcus tétragenes* ne possède une capsule que dans les milieux albumineux.

L'examen par notre méthode, d'une souche de ce germe nous a permis de confirmer ce résultat. Nous avons, là aussi, pu mettre en évidence la présence d'un corps microbien central noir entouré d'une membrane cellulaire assez développée, et d'une capsule qui sur les milieux albumineux, apparaît assez volumineuse.

Cette capsule faisait totalement défaut sur les milieux artificiels.

c) *Leuconostoc mesenteroïdes*. — On voit quelquefois dans les sucreries et distilleries des dissolutions de mélasses se transformer en masses gélatineuses compactes composées de grumeaux insolubles, empâtés dans une liqueur visqueuse. La matière gélatineuse formée (« frai de grenouille ») est le résultat d'une action microbienne. Le germe incriminé est le *leuconostoc mesenteroïdes*.

La souche que nous avons étudiée venait d'une solution sucrée devenue visqueuse à la longue.

1. Tandis que la capsule du pneumobacille est constituée par une gomme (voir chap. II) Kramar (*Centr. für Bakt. Orig.*, t. LXXXVII, 1922, p. 401) a démontré que celle de la Bactéridie charbonneuse était formée par un glyco-protéide.

L'examen de ce germe à l'encre de Chine, rappelle en certains points ce que nous avons vu pour le pneumobacille.

Si l'on isole sur pomme de terre ou sur gélatine non sucrée les éléments provenant de notre solution, on obtient une culture assez abondante, qui, examinée au microscope, par la méthode à l'encre de Chine, nous montre des éléments en chapelets, formés selon la règle générale, d'un corps microbien noir et d'une membrane très réfringente. Si nous repiquons une parcelle de culture sur une solution sucrée, l'examen de la culture de vingt-quatre heures, nous montre cette fois des chapelets identiques, mais entourés d'une gaine hyaline énorme qui constitue une véritable capsule. Au bout de quarante-huit heures, les chapelets de corps microbiens se sont entourés de substance visqueuse et donnent naissance à de longs boudins réfringents qui ne restent ni circulaires, ni rectilignes, mais se recourbent de façon très irrégulière, se pelotonnent sur eux-mêmes et forment en se développant et en se segmentant des corps muqueux rappelant l'aspect des replis du mésentère, d'où leur nom. On peut alors observer à ce stade la présence de formes amiboïdes ou en panaches, ainsi que celle de nombreux corps microbiens dans une seule capsule tout comme pour le pneumobacille.

Au bout de trois jours, la gangue se ramollit et se dissout peu à peu, puis les chapelets de grains se dissocient et s'isolent, et l'on revient à l'aspect

obtenu sur pomme de terre. Le liquide est alors excessivement visqueux.

Si l'on reporte ces éléments sur un liquide neuf, la même succession de phénomènes se reproduit.

La méthode à l'encre de Chine permet de suivre aisément tous ces divers stades et l'on ne peut qu'être frappé par la similitude des phénomènes que l'on observe d'une part chez le *leuconostoc* et d'autre part chez le pneumobacille, alors que rien ne semblait faire prévoir un rapport quelconque entre ces deux germes qui sont si différents au premier abord.

Ces analogies ne se limitent d'ailleurs pas à ces deux espèces microbiennes comme nous aurons l'occasion de le voir dans le chapitre III.

d) *Pneumocoque*. — La question de la capsule du pneumocoque est d'une importance considérable. « C'est, de l'association capsule et forme lancéolée que résulte l'image classique du pneumocoque » et ... « chacun sait que la capsule est plus facilement décelable *in vivo*, dans les exsudats et les humeurs des sujets infectés, et qu'*in vitro* on doit s'adresser de préférence aux milieux additionnés de liquides organiques (sérum, sang, lait, etc...). Elle est plus développée chez les pneumocoques dont les cultures ont une consistance muqueuse, visqueuse, mais en général plus difficile à mettre en évidence que le corps bactérien lui-même », ... « Il serait très utile de posséder un procédé qui réalisât régulièrement la coloration des capsules dans les milieux de culture ; lorsqu'on se trouve en présence d'un germe non

pathogène, on aurait souvent là un caractère précieux pour le diagnostic (1). »

Notre méthode nous permettait d'examiner la question de la capsule du pneumocoque et de voir si vraiment elle existait dans les milieux liquides. Le problème était ici de même nature que celui soulevé à propos du pneumobacille.

Les observations suivantes que nous avons faites en collaboration avec M. le Dr Lévy-Bruhl (2), concernent toute une série de pneumocoques isolés au laboratoire de M. le Professeur M. Nicolle. Chaque échantillon a été examiné sur divers milieux (bouillon T, gélose T (3), sérum de lapin, sang de souris inoculées). Pour les pneumocoques du type III, nous avons en outre étudié les capsules sur le bouillon Martin glucosé à 2 pour 1.000 et sur le bouillon Martin non glucosé.

1. L. Coton, C. Truehe et Mlle Raphaël, *Pneumocoques et affections pneumococciques* (Monographies de l'Institut Pasteur). Masson, éd., 1922, p. 15.

2. M. Lévy, Bruhl et P. Borin (*C. R. de la Soc. de Biol.*, t. XCII, n° 17, 22 mai 1925, p. 1343).

3. Le bouillon T a pour formule :

Peptone Chapoteaut	4 granimes
Cl Na.....	0 gr. 50
Glucose.....	0 gr. 20
Eau.....	100 grammes

On alcalinise avec de la soude jusqu'à léger virage de la phénolphtaléine. Additionné de 2 o/o de gélose, il donne la gélose T.

PNEUMOCOQUES DU TYPE I

Désignation	Bouillon T	Sérum lapin	Sang de souris	Gélose T
Bern.....	—	—	—	—
Lar.....	—	+	+	—
Thom.....	—	—	—	—
M ₁₇	—	—	—	—

— : pas de capsules.

± : mince capsule.

÷ : capsule nette.

Remarque I. — Ce résultat semble paradoxal. En vérité, il ne faut pas conclure hâtivement à l'absence de capsules chez les pneumocoques du type I, car notre examen a porté sur un trop petit nombre de germes. Nous avons eu entre les mains de nombreux échantillons de pneumocoques du type I dont la capsule pouvait être mise en évidence dans les milieux albumineux. Les échantillons examinés ici n'en possèdent pas (ou alors, elle est peu développée, et réduite à un mince liseré grisâtre).

Ce que l'on peut dire, c'est que la présence d'une capsule, *n'est pas un caractère constant chez les pneumocoques du type I ; elle peut faire défaut.*

Remarque II. — Dans cette étude, nous avons été frappé par le fait que la membrane cellulaire des pneumocoques était parfois de grosses dimensions ; on aurait même pu la confondre avec une capsule. Mais la membrane capsulaire ainsi mise en évidence ne possède pas du tout les caractères optiques de la

capsule vraie. La première est caractérisée par sa forte réfringence à l'encontre de la seconde qui n'en possède qu'une très faible. Nous insistons sur cette particularité et nous aurons l'occasion d'y revenir lorsque nous parlerons de la coloration des capsules.

PNEUMOCOQUES DU TYPE II

Désignation	Bouillon T	Sérum de lapin	Sang de souris	Gélose T
—	—	—	—	—
Adl.....	—	—	—	—
Denis.....	—	—	—	—

Nous pouvons faire ici les mêmes remarques que pour les pneumocoques du type I. Malgré le tableau qui précède, il y a des pneumocoques II qui possèdent une capsule, mais elle est souvent peu développée.

D'ailleurs l'examen de deux échantillons n'est pas suffisant pour permettre de tirer de fermes conclusions. Il est cependant intéressant de signaler ces résultats pour leur caractère d'exception, car ils montrent que des pneumocoques du type II peuvent *même in vivo, ne pas avoir de capsule*. Ces deux observations suffisent à elles seules pour infirmer la règle générale qui fait considérer les pneumocoques comme des germes pourvus de capsule.

PNEUMOCOQUES DU TYPE III

(Streptococcus mucosus capsulatus, de beaucoup d'auteurs)

Désignation	Bouillon T	Bouillon Martin gluc.	Bouillon Martin non glucosé	Sang de souris	Gélose T
Bl....	+	+	—	+	+
Ap....	+	+	—	+	+
Dan...	+	+	—	+	+
Mull..	+	+	—	+	+
Gasn..	+	+	—	+	+
Duc...	+	+	—	+	+
Vass...	+	+	—	+	+
Deg...	+	+	—	+	+
Baub..	+	+	—	+	+
Gaill..	+	+	—	+	+

L'examen de ce tableau est frappant. Alors que la capsule fait facilement défaut lorsqu'on s'adresse à des pneumocoques I ou II, c'est ici le contraire.

En bouillon T, tous les germes sans exception présentent une capsule, et, fait à noter, autant les capsules des types I et II étaient peu développées, autant celles-ci sont de dimensions considérables. Elles sont parfois plus volumineuses que les capsules du pneumobacille. Comme chez ce dernier, *on observe que la dessiccation de la préparation cause sa rétraction. La capsule se gonfle au contact d'une grande quantité d'eau et finit par s'y dissoudre.* Cette constatation nous amène à supposer que les capsules du pneumocoque et du pneumobacille ont une composition chimique sinon identique, du moins très voisine (1). Les formes anormales

1. Quoique des recherches systématiques sur la nature chimique des capsules de pneumocoques, n'aient pas encore été

peuvent s'observer là aussi (formes amiboïdes, panaches). Lorsque le pneumocoque est en chaînette, il y a parfois réunion des deux extrémités de celle-ci, et la capsule a la forme d'un anneau. D'autres fois on observe dans une même capsule la présence de nombreux diplocoques.

En bouillon Martin glucosé, on trouve des formes analogues. En bouillon Martin non glucosé par contre, il ne se forme pas de capsules et cependant le germe pousse assez abondamment.

L'examen du sang de souris infectées montre des germes fortement capsulés.

Sur gélose T l'aspect est typique. Les colonies sont grosses, transparentes, à bords irréguliers, et *muqueuses*.

PNEUMOCOQUES ATYPIQUES

Ce sont des germes solubles dans la bile, possédant tous les caractères des pneumocoques, mais n'agglutinant (même après la méthode de Porges (1) modifiée) par aucun des sérums I, II, ou III.

faites à notre connaissance, il faut signaler les intéressantes recherches de Michael Heidelberger et O. T. Avery sur une «substance spécifique soluble des pneumocoques» qu'ils ont identifiée comme étant de la nature des polysaccharides, et qu'ils isolent des cultures ainsi que du sang des animaux infectés. Ne serait-ce pas là tout simplement le résultat de la dissolution de la capsule ? Il existe peut-être une analogie avec le pneumobacille dont la capsule est formée aussi par un polysaccharide (Michael Heidelberger et O. T. Avery, *Journal of experimental Medicine*, 1^{er} sept. 1924).

1. En 1905, Porges a constaté que beaucoup de bacilles encapsulés, très muqueux et insensibles aux agglutinines pouvaient

Désignation	Bouillon T	Serum de lapin	Sang de souris	Gélose T
—	—	—	—	—
Sinusite	—	—	—	—
Pneu B ₁	—	—	—	—
Dujarric	—	—	—	—
Oreille	—	—	—	—
Otite L P	—	—	—	—
Cés.	—	+	+	—
Courn	—	—	—	—
Cobaye 4	—	—	—	—

Ce groupe de pneumocoques ne présente pas non plus de capsules. Dans un cas seulement (pneum. Cés...) il y a apparition d'un mince liseré grisâtre autour de la membrane cellulaire.

Si nous voulons tirer des conclusions de ce qui précède concernant les pneumocoques, nous sommes forcés d'énoncer beaucoup de faits contraires à l'opinion courante.

Et tout d'abord, la présence d'une capsule autour des pneumocoques, ne constitue pas un caractère fondamental. Une même méthode ne nous montre-t-elle pas des capsule *in vivo*, et *in vitro*, chez certains pneumocoques, et pas chez d'autres ?

Par conséquent si dans un but de diagnostic, on examine par notre méthode des diplocoques lancéolés et prenant le Gram, il ne faudra pas rejeter l'hypothèse de pneumocoque si l'on ne trouve pas de capsules. Il faudra se reporter aux autres caractères (solubilité dans la bile, agglutination par les sérums, etc...).

être rendus agglutinables après traitement par l'acide chlorhydrique dilué à chaud. Voir à ce sujet : M. Nicolle, Jouan et Debains (C. R. de la Soc. de Biol., 12 octobre 1918).

De plus, il semble que les pneumocoques du typ III se différencient nettement des autres par la présence d'une capsule qui ne fait jamais défaut et qui est d'un volume énorme. Cette capsule disparaît sur les milieux dépourvus de glucose. Sur gélose T elle accompagne presque toujours le caractère muqueux des colonies. .

CHAPITRE II

Le présent chapitre comporte deux parties. Dans la première, nous étudierons la composition chimique de la capsule, dans la deuxième, quelques-unes de ses propriétés les plus intéressantes.

PREMIÈRE PARTIE

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA CAPSULE DU PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÄNDER

Au début de ce travail nous avons déjà signalé le fait que la plupart des auteurs ayant cherché à colorer les capsules du pneumobacille, ne se sont nullement préoccupés d'en connaître la composition chimique. Or nous verrons que son étude permet de mieux comprendre les raisons des insuccès auxquels aboutissent les divers auteurs, et fournit de précieuses indications sur l'action des divers agents fixateurs et colorants.

L'étude de la composition chimique de la capsule nécessite l'obtention de grosses masses microbiennes. Les difficultés que présente une telle opération (matériel approprié, surtout) éloignent souvent l'attention des chercheurs de l'étude chimique des bactéries. Ces études sont pourtant de la première importance.

« Raulin dans ses recherches classiques, ne nous a-t-il pas appris que seule la pesée de récoltes *palpables* permet d'aborder les questions de biologie microbienne? Cette pesée permettra également de reconnaître (parfois d'emblée) des bactéries d'espèces très voisines (Bacille typhique, Colibacille). Enfin la culture massive représente un *moyen de grossissement* précieux, de tous les caractères microbiens (aspect propre, couleur, consistance...) qui accentue souvent dans une grande mesure, les différences d'espèce et même de race. »

« On ne connaît et on ne reconnaît une bactérie que lorsqu'on en a manié plusieurs grammes à maintes reprises » (M. Nicolle et Alilaire) (1).

Peu d'auteurs ont étudié la composition chimique de la capsule du pneumobacille de Friedlænder. On ne peut citer que Hamm (2) et surtout Tœnniessen (3) dont les recherches ont inspiré une partie de ce chapitre.

Dans les pages qui vont suivre, nous allons faire l'étude de ces deux travaux. Les résultats auxquels aboutissent les deux auteurs sont différents. Nous avons repris et vérifié le travail de Tœnniessen, en employant une technique plus parfaite.

Nous exposerons donc en premier lieu la technique que nous avons suivie et les conclusions auxquelles

1. M. Nicolle et E. Alilaire, *Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique* (Annales de l'Institut Pasteur, t. XXIII, juillet 1909).

2. Hamm, *Centr. f. Bakt.* Orig. 1, t. XLIII, 1907.

3. Tœnniessen, *Centr. f. Bakt.*, Orig., t. 85, p. 225.

nous sommes arrivé. Puis nous étudierons la technique de Hamm, en signalant les imperfections qui ont conduit cet auteur à formuler des conclusions erronées.

Analyse de la capsule. Recherches de Toënniessen et recherches personnelles

a) *Principe*. — La substance capsulaire étant soluble dans l'eau (voir chap. I^{er}, p. 43), on la sépare des corps microbiens au moyen de ce dissolvant, puis on la précipite de la liqueur ainsi obtenue à l'aide d'un réactif approprié (l'alcool dans ce cas).

b) *Technique*. — Pour obtenir une récolte abondante, nous avons opéré de la façon suivante :

Nous sommes partis d'un échantillon microbien présentant les caractères classiques du pneumobacille. Une culture en bouillon Martin âgée de vingt-quatre heures a servi à ensemer 25 tubes de gélose. Après quarante-huit heures les tubes ont été utilisés pour ensemer 50 boîtes de Roux de 12 centimètres sur 21 centimètres et contenant de la gélose au bouillon Martin.

Au bout de trois jours d'étuve, la récolte est abondante. Une boîte donne en moyenne 4 grammes de microbes frais, ce qui nous fait une récolte totale de 200 grammes environ.

Pour collecter la masse microbienne de chaque boîte, on introduit dans chacune d'elles une trentaine de perles de verre stériles et 30 centimètres cubes

d'eau distillée. En agitant convenablement les boîtes, on fait rouler les perles à la surface de la gélose, afin de détacher la masse microbienne visqueuse assez adhérente, puis on verse l'émulsion obtenue dans un verre à pied.

Nous avons ainsi recueilli 1.175 centimètres cubes d'émulsion microbienne, auxquels nous avons ajouté 117 cmc. 5 d'une solution d'acétate de soude à 13,6 o/o et 10 centimètres cubes d'acide acétique. Le tout, après agitation est additionné de 3.875 centimètres cubes d'alcool à 96°, soit 3 volumes d'alcool pour 1 volume d'émulsion. On laisse en contact seize heures environ. La masse microbienne se réunit en un coagulum ferme et résistant, et le liquide s'éclaircit rapidement.

Il faut éliminer maintenant la peptone et les sels. On y parvient par 3 ou 4 lavages, d'abord dans de l'alcool à 96°, puis dans des alcools de degrés croissants. Si on examine alors les derniers liquides alcooliques, il faut qu'après évaporation au bain-marie et reprise par l'eau la réaction du biuret soit négative. A ce moment, on déshydrate la masse dans des alcools de concentrations croissantes. On broie finement dans l'alcool absolu, on élimine l'alcool par l'éther et celui-ci par évaporation dans le vide.

On obtient ainsi une poudre blanchâtre, légère. Cette poudre provenant de 200 grammes environ de corps microbiens frais est émulsionnée dans 500 centimètres cubes de KOH à 10 o/o. Le produit gonfle. On agite et on laisse en contact pendant vingt-

quatre heures, puis on porte dix minutes au bain-marie bouillant. Le liquide jaunit légèrement. *On filtre alors à la bougie Chamberland F*, opération qui a duré plus de quarante-huit heures. La solution claire obtenue est neutralisée exactement par l'acide acétique; la coloration jaune disparaît. On ajoute alors un léger excès d'acide acétique. Le liquide ne précipite pas et ne devient pas opalescent. Une partie aliquote de la solution ne précipite pas par le ferrocyanure de potassium acétique. On fait alors dissoudre 10 grammes d'acétate de soude dans le liquide acide, et on ajoute 3 volumes d'alcool à 96°. Il se forme un abondant précipité que l'on recueille par centrifugation. Ce précipité est lavé plusieurs fois à l'alcool et à l'éther et desséché.

Nous y avons recherché l'azote par la réaction du bleu de Prusse.

0 gr. 20 de poudre desséchée sont chauffés au rouge dans un petit tube en présence d'un fragment de sodium. Le tube est ensuite immergé brusquement dans 5 centimètres cubes d'eau distillée. On agite et on filtre. Dans le filtrat, on ajoute un cristal de sulfate ferreux, 2 gouttes d'acide chlorhydrique, et 1 goutte de solution aqueuse de perchlorure de fer dilué au 1/5. Il ne se forme ni précipité, ni coloration bleue. *La poudre ne contient donc pas d'azote.*

c) *Identification du produit obtenu.* — 0 gr. 50 de produit sont chauffés à l'autoclave à 115 degrés pendant deux heures dans 50 centimètres cubes d'acide sulfurique à 3 o/o. Le liquide final légèrement jau-

nâtre est neutralisé par le carbonate de baryum et filtré. Le filtrat est lavé à plusieurs reprises par de petites quantités d'eau chaude. Les liquides filtrés sont réunis et on évapore au B. M. jusqu'à réduction à 10 centimètres cubes. Six centimètres cubes de cette solution sont additionnés d'une solution de 0 gr. 40 de phénylhydrazine et 0 gr. 60 d'acétate de soude dans 3 centimètres cubes d'eau. On abandonne le tout pendant une nuit. Il ne se forme aucun cristal (*pas de mannose*).

Le liquide est alors chauffé pendant trois quarts d'heure au B.-M. bouillant. Il se trouble par refroidissement, et après une nuit, se forment des cristaux qu'on lave à l'eau et fait recristalliser dans l'alcool à chaud. Le point de fusion de ces cristaux est de + 194 degrés (fusion lente avec dégagement de gaz) et + 214 degrés (fusion instantanée).

Cette osazone se présente sous forme de lamelles libres ou groupées de diverses manières. Elle est presque insoluble dans l'eau bouillante et dans l'alcool méthylique.

La solution aqueuse du produit capsulaire ne réduit pas la liqueur de Fehling, mais la réduction a lieu avec le produit d'hydrolyse. La solution ne précipite pas par l'acétate neutre de plomb dissous, mais précipite par l'acétate basique.

La solution hydrolysée donne une coloration rouge orangé avec une solution au 1 pour 1.000 d'orcine dans l'acide chlorhydrique concentré (Réaction des hexoses).

Elle ne donne pas de coloration avec l'orcine et l'acide chlorhydrique étendu (*pas de sucre cétonique*) (Sélivanoff).

Ces considérations chimiques nous ont ainsi conduit à conclure que la substance isolée était *un polysaccharide du galactose ou galactane*.

d) *Teneur en eau de la substance capsulaire*. — Nous ne pouvons donner ici que des chiffres approximatifs. Pour calculer la teneur en eau de la substance capsulaire, on déshydrate en effet la masse microbienne par l'alcool ; on enlève ainsi forcément un peu d'eau au corps microbien et à la membrane. Mais l'examen du microbe avant et après dessiccation (voir Chap. I, p. 20 et suiv.) nous montre que la grande majorité de l'eau qui entre dans la composition du bacille est contenue dans la capsule, et que c'est elle que l'on peut séparer le plus facilement.

On râcle donc délicatement, sans attaquer le milieu gélosé, la couche de deux boîtes de Roux. La masse microbienne pesée est déshydratée par des alcools de degrés croissants puis on lave à l'éther, on sèche et on pèse. La différence de poids indique la teneur approximative des capsules en eau.

Premier essai. — Récolte provenant de deux boîtes de Roux = 8 grammes. Après déshydratation par les alcools de 60 degrés à 100 degrés, lavage à l'éther, et séchage au vide.

Poids du résidu = 0 gr. 72.

Poids de l'eau pour 100 grammes de microbes :

$$\frac{(8 - 0,72) \times 100}{8} = 91 \text{ o/o.}$$

Deuxième essai. — Poids de la récolte de 2 boîtes de Roux = 6 gr. 35.

Après déshydratation, poids du résidu = 0 gr. 51.

Poids de l'eau :

$$\frac{(6,35 - 0,51) \times 100}{6,35} = 92 \text{ o/o.}$$

La capsule contient donc une quantité d'eau énorme.

Remarques. — 1. — Tœnniessen n'employait pas la gélose Martin pour cultiver son pneumobacille, mais un milieu ainsi constitué :

Eau de viande.....	100
Gélose..	1,5
Peptone.....	1
ClNa.....	0,5
Glycérine.....	3

L'échantillon étudié poussant abondamment sur la plupart des milieux, nous avons employé la gélose Martin qui nous a donné de très bons résultats.

Pour purifier sa gomme, Tœnniessen la dissolvait dans l'eau, la centrifugeait longuement pour séparer autant que possible les corps microbiens, la reprécipitait par l'alcool, et répétait plusieurs fois de suite cette série d'opérations. Or, nous avons pu constater qu'il est pratiquement impossible, même, avec une centrifugeuse très puissante de séparer complètement des corps microbiens de la solution gommeuse. C'est pourquoi Tœnniessen trouvait que son liquide donnait par l'acide acétique une faible opalescence. Cette réaction provenait vraisemblablement

des nucléo-protéides des corps bactériens entraînés mécaniquement. Effectivement, en filtrant le liquide à la bougie comme nous l'avons fait, nous n'avons pas eu la moindre opalescence avec l'acide acétique.

II. — On peut faire une remarque du même ordre à propos de la teneur de la capsule en azote. Après chaque purification de son produit Tœnnies-sen dosait l'azote par la méthode de Kjeldahl. En opérant sur 0 gr. 10 de produit, il trouvait 2 0/0 d'azote après la première précipitation, 0,75 0/0 après la troisième, 0,28 après la cinquième. Il en concluait que l'azote s'éliminant ainsi peu à peu par les lavages, n'était pas un constituant de la gomme, mais qu'il était très difficile de s'en débarrasser.

En purifiant la gomme par filtration, nous avons obtenu un produit ne contenant pas d'azote. Celui-ci provenait donc vraisemblablement des corps microbiens.

III. — La forte teneur en eau de la capsule pouvait être prévue dès l'examen microscopique. N'avons-nous pas vu la gomme se dessécher sous nos yeux ? (voir chap. I, p. 25).

Nous pouvons donc affirmer maintenant que les auteurs ont décrit sous le nom de « capsule » un ensemble constitué par : *membrane cellulaire et galactane*.

Recherches de Hamm.

a) *Technique*. — Hamm fait des cultures de pneumobacille sur gélose. Au bout de quarante-huit

heures, ces cultures sont grattées et émulsionnées dans de la soude à 0, 1 0/0. On laisse déposer et on décante le liquide surnageant.

Ce liquide chauffé à l'ébullition ne précipite pas, mais additionné à froid d'acide acétique, il donne un précipité insoluble dans un excès.

Hamm prend d'autre part 40 centimètres de l'émulsion microbienne primitive et l'additionne de 10 centimètres cubes d'HCl au 1/3. Il hydrolyse au B-M bouillant pendant dix minutes. Après refroidissement, il centrifuge le liquide pendant deux heures et obtient un liquide jaunâtre, contenant exclusivement la substance capsulaire, sans aucun microbe (?) et un culot formé de germes décapsulés. Le liquide est fortement alcalinisé par la soude, et on l'additionne de quelques gouttes d'une solution étendue de sulfate de cuivre. On porte à l'ébullition ; il ne se produit pas de réduction.

Hamm conclut de ses recherches que la substance capsulaire ne contient pas de mucine, mais un nucléo-protéide.

b) *Critique.* — La technique suivie par Hamm n'est pas assez rigoureuse pour qu'il puisse affirmer que la capsule du pneumobacille est formée de nucléo-protéides.

Son essai à l'acide acétique n'est pas du tout convaincant. Nous avons vu plus haut (Remarque I. p. 62) que le louche ou le précipité obtenus étaient dus à ce que la solution était impure. Après filtration à la bougie, elle ne fournit plus la réaction.

D'ailleurs, si toute la substance capsulaire était formée de nucléo-protéides, la solution en contiendrait suffisamment pour donner un précipité abondant.

De plus Hamm opère sur un liquide contenant beaucoup trop d'impuretés. Pour montrer que notre substance capsulaire n'était ni un nucléo-protéide, ni une mucine, nous l'avons isolée et purifiée, tandis qu'ici, l'auteur opère avec une solution provenant de la macération alcaline de corps microbiens et pouvant contenir outre la substance capsulaire, de nombreux composés (albumoses, peptones, protides provenant des corps microbiens) ce qui fausse la réaction à l'acide acétique.

Enfin Hamm se sert toujours de ce liquide impur pour faire la recherche du pouvoir réducteur de la solution (dans le cas où il y aurait de la mucine). Là encore, la méthode employée n'est pas assez sensible. On sait quelles difficultés l'on rencontre pour rechercher des traces de glucose lorsque l'on se trouve en présence d'un milieu complexe contenant différents produits, tels que les albumoses, les peptones, etc. Il est nécessaire dans ces cas, d'opérer sur un liquide purifié par défécation au moyen d'un réactif approprié (R. de Patein, R. de Courtonne) et d'employer une liqueur de Fehling de concentration convenable.

Or, Hamm ne défèque pas son liquide, ne le concentre pas, opère dans des conditions où sa gomme est insuffisamment hydrolysée, et sur une quantité

trop faible de matière première. Comment s'étonner alors qu'il n'obtienne pas de réduction ?

Toutes ces considérations nous permettent de conclure que le travail de Hamm est entaché de nombreuses erreurs dues à ce que sa technique est par trop imparfaite. La technique de Tœnniessen avec les modifications que nous lui avons apportées, répond à de meilleures conditions, et les résultats que nous avons obtenus grâce à elle, nous permettent de conclure que *la capsule du pneumobacille de Friedländer ne contient ni macine, ni nucléo-protéide, mais uniquement un polysaccharide du galactose : le galactane.*

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES COMPLÉMENTAIRES SUR LA CAPSULE

Décapsulation du pneumobacille

Etant donné un échantillon de pneumobacille pourvu d'une capsule visible par le procédé à l'encre de Chine à l'état frais, il est possible de l'en débarrasser par différents moyens, les uns d'ordre chimique, les autres d'ordre biologique.

a) *Par voie chimique.*

1° *Par macération prolongée dans l'eau.* — L'eau mise au contact des capsules les fait d'abord gonfler, puis les dissout à la longue, ce qui est conforme

à la nature gommeuse de la capsule. Le galactane a en effet pour propriété de se gonfler d'abord dans l'eau puis de s'y dissoudre à la longue. Ce phénomène a été suivi au microscope (voir chap. I p. 42). Cette dissolution de la capsule se fait suivant certaines proportions : en effet, si la substance capsulaire se dissolvait trop facilement, les milieux liquides ne contiendraient pas de capsules. Or, tous les milieux liquides en contiennent. Comment nous expliquer cette particularité ?

Il suffit de faire l'expérience suivante :

On prépare une solution aqueuse de gélose à 1 pour 2000. La gélose est une substance qui par hydrolyse donne une majeure partie de galactose : comme la capsule du pneumobacille, elle contient donc du galactane.

On dispose sur un porte-tubes une série de tubes à essais, et dans chacun d'eux, on introduit des doses croissantes de la solution précédente, d'après le tableau ci-dessous.

N° des tubes	Eau en cc.	Gélose à 1/2000 en cc.	Teneur pour 1000 en gélose
1	20	0	0
2	18	2	0,05
3	16	4	0,10
4	14	6	0,15
5	12	8	0,20
6	10	10	0,25 (1/4000)
7	8	12	0,30
8	6	14	0,35
9	4	16	0,40
10	2	18	0,45
11	0	20	0,50 (1/2000)

Dans chacun de ces tubes, on ajoute 1 centigramme environ d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose de pneumobacille. On agite énergiquement jusqu'à émulsion homogène et on laisse en contact pendant deux heures.

Au bout de ce temps, on centrifuge énergiquement pendant une demi-heure. Le culot de centrifugation se forme plus ou moins bien suivant les tubes.

Dans le tube n° 1 sans gélose, on obtient très facilement un culot bien compact. L'examen à l'encre de Chine à l'état frais montre des germes pourvus d'un corps microbien, d'une membrane cellulaire, *mais sans capsule*.

Le tube n° 2, présente des microbes ayant le même aspect. Dans les tubes n° 3 et n° 4, on observe un mélange de germes capsulés et de germes dépourvus de capsule.

Dans le tube n° 5, il n'y a plus que des germes capsulés. Puis, à mesure que l'on opère sur des tubes de plus en plus riches en gélose, le culot de centrifugation est moins compact (ce qui indique que la centrifugation s'est faite plus difficilement), et ne contient plus que des germes capsulés.

Ainsi les capsules ne se dissolvent que dans les liquides contenant peu de gélose, et cela jusqu'à une teneur en gélose égale à 0,15 pour mille. Tout se passe comme s'il y avait dissolution de la gomme capsulaire jusqu'à ce que la solution en contienne un certain taux; puis les capsules demeurent intactes.

2° *Par les acides ou les alcalis dilués à chaud.* —

On introduit dans des tubes contenant divers acides (chlorhydrique, acétique) ou alcalis (NaOH, KOH) à des dilutions variant de 10/0 à 10/00, un centigramme de culture solide de pneumobacille. On porte les tubes un quart d'heure au B. M. bouillant. Puis on refroidit brusquement et on centrifuge. La centrifugation se fait très facilement et on obtient finalement un culot qui, examiné à l'encre de Chine à l'état frais, ne présente dans chaque tube que des microbes dépourvus de capsules. Dans cette opération, il y a eu vraisemblablement hydrolyse partielle de la gomme capsulaire, mais l'hydrolyse n'a pas été suffisante pour être totale. Les acides et les alcalis ont simplement favorisé la dissolution de la gomme.

Cette décapsulation est en somme le fondement de la méthode indiquée par Porges pour rendre agglutinables de nombreux germes encapsulés très muqueux et insensibles aux agglutinines, et modifiée par M. Nicolle, Jouan et Debains (voir note p. 52).

b) *Par voie biologique*

Tœnniessen (1) arrive à obtenir des pneumobacilles dépourvus de capsule, mais conservant encore leur membrane, en repiquant sur gélose de trois

1. Tœnniessen, *Sur l'hérédité et la variabilité chez les Bactéries, avec étude spéciale de la virulence* (Centr. f. Bakt. Orig., vol. 73).

jours en trois jours une souche de ce germe. Au bout de vingt jours la culture provenant du dernier repiquage présente un aspect particulier. Tandis que la première souche avait formé sur gélose une culture très abondante, épaisse, visqueuse, brillante, la dernière est au contraire maigre et sèche. On peut observer par endroits de petites colonies blanchâtres, d'aspect mat. Ensemencées en stries sur un autre tube de gélose, celles-ci fournissent des colonies ayant l'aspect de la colonie mère. Leur examen microscopique par l'encre de Chine, montre des germes dépourvus de toute capsule. Les germes sont encore vivants ; ils poussent abondamment sur les milieux de culture, mais sitôt qu'on les injecte à l'animal, on les retrouve dans les organes et dans le sang pourvus à nouveau d'une capsule.

Ainsi, par simples passages à travers les milieux, Tœnniessen aboutit à des pneumobacilles dépourvus de capsules. Cet auteur appelle type normal (Normaler Typus) le germe primitif capsulé et type mutant (Mutante) le germe dépourvu de sa capsule.

Personnellement, nous avons observé que si on abandonne à la température du laboratoire une culture en bouillon Martin ou sur gélose, sans faire de repiquages, on observe que les capsules microbiennes disparaissent à la longue. On ne saurait dire que la capsule s'est dissoute dans le milieu, puisqu'elle ne peut exister que si le milieu est pour ainsi dire saturé de galactane. L'objection tomberait d'ailleurs pour les cultures sur gélose. Que devient-elle ?

Peut-être est-elle utilisée par le bacille lui-même (demeuré vivant) qui ayant employé tous les matériaux nutritifs contenus dans le bouillon, s'en servirait comme d'une substance de réserve ?

Les capsules dans les cultures anaérobies

La présence à la surface des bouillons de culture d'une collerette visqueuse riche en germes capsulés, nous avait fait penser que la présence de l'oxygène était peut-être indispensable à la formation des capsules. Aussi avons nous cherché à élucider ce problème.

Une série de tubes de bouillon Martin sont ensemencés avec une culture de pneumobacille ; on fait le vide dans le tube à l'aide de l'appareil de Roux, modifié par Legroux (1). On scelle les tubes et on les porte à l'étuve à 37 degrés pendant vingt-quatre heures. Le milieu se trouble uniformément mais il n'y a plus de collerette. L'examen des germes par l'encre de Chine montre toujours des capsules.

Nous avons fait des repiquages successifs en milieux anaérobies. L'examen des cultures obtenues nous a toujours montré des capsules.

L'oxygène n'est donc pas indispensable à leur formation.

R. Legroux, *Modifications de l'appareil vide-hydrogène, pour les cultures anaérobies en milieux liquides* (Annales de l'Inst. Pasteur, 1912, p. 635).

Vitalité du pneumobacille dépourvu de capsule

Le pneumobacille dont la capsule a été enlevée par macération prolongée dans l'eau est-il encore vivant ?

Nous allons nous en assurer par l'inoculation et l'ensemencement.

a) *Inoculations.* — Emulsionnons dans 2 centimètres cubes d'eau physiologique le culot de centrifugation d'une macération aqueuse d'une heure d'un centigramme environ de corps microbiens frais. Assurons-nous par l'examen à l'encre de Chine que tous les germes sont dépourvus de capsules et inoculons deux souris sous la peau avec 1/2 centimètre cube de l'émulsion obtenue et deux souris dans le péritoine avec la même dose.

Ces souris succombent rapidement à l'infection (de 14 heures à 24 heures). En faisant des examens de tous les organes par l'encre de Chine, on voit que le sang, le péritoine, la rate, le foie de toutes les souris contiennent des pneumobacilles *encapsulés*. L'ensemencement des cerveaux donne une culture pure de pneumobacille encapsulé.

Par conséquent, *le pneumobacille de Friedländer artificiellement décapsulé est encore vivant, et retrouve sa capsule par passage à travers l'animal.*

b) *Ensemencements.* — Préparons une émulsion analogue à celle qui nous a servi dans l'expérience

précédente. Assurons-nous de l'absence de germes capsulés et ensemençons cette émulsion sur la gélose et en bouillon Martin.

Après vingt-quatre heures, *les cultures se montrent abondantes*, et présentent les caractères classiques de culture des germes intacts. Leur examen à l'encre de Chine *nous montre uniquement des germes capsulés*.

Remarque. — On pourrait nous objecter que les résultats précédents sont peut-être dus à ce qu'il a pu se trouver parmi les germes décapsulés des germes ayant échappé à l'action de l'eau.

Nous ferons remarquer que si quelques germes ont conservé leur capsule, ils ne sont qu'en infime proportion.

L'examen à l'encre de Chine du culot de centrifugation ne nous montre (sur plusieurs centaines de bacilles examinés) *aucun* germe intact. Or en ensemençant le culot sur plaques de gélatine de façon à obtenir des colonies isolées, on voit qu'elles sont uniquement formées de germes capsulés, ce qui indique que tous les pneumobacilles dépourvus de leur capsule, *l'ont retrouvée par passage sur les milieux ordinaire*.

Virulence comparée du pneumobacille capsulé et décapsulé

Puisque nous pouvions facilement décapsuler le pneumobacille de Friedlænder, il était intéressant

de comparer la virulence des germes intacts et des germes dépourvus de leur capsule.

Voici la technique que nous avons employée : On ensemente 20 centimètres cubes de bouillon Martin, et au bout de vingt-quatre heures, on agite la culture de façon à émulsionner la collerette et à avoir une suspension homogène.

On prélève 5 centimètres cubes de liquide et on les additionne de 20 centimètres cubes d'eau distillée. On laisse en contact pendant une demi-heure, puis on centrifuge à grande vitesse pendant le même temps. On s'assure que le liquide surnageant le dépôt est limpide et ne contient plus aucun germe ; sinon il faut centrifuger jusqu'à ce que l'on ait obtenu ce résultat.

Le dépôt examiné à l'encre de Chine présente encore parfois quelques germes capsulés. On l'émulsionne à nouveau dans 20 centimètres cubes d'eau, on laisse macérer une demi-heure, et on centrifuge. L'opération se poursuit ainsi jusqu'à ce que finalement les germes soient dépourvus de capsules.

D'autre part, on filtre à la bougie Chamberland F, 10 centimètres cubes de la culture et on émulsionne le culot de germes dans 5 centimètres cubes de ce bouillon filtré.

Nous avons ainsi deux émulsions microbiennes. L'une est représentée par 5 centimètres cubes de culture de 24 heures ; l'autre par 5 centimètres cubes de la même culture, mais où les germes sont décapsulés. Nous avons émulsionné le culot dans du bouil-

lon de culture filtré pour avoir deux suspensions aussi comparables que possible, le bouillon pouvant contenir une toxine.

Il suffit d'opérer le titrage des 2 émulsions microbiennes sur la souris. On injecte sous la peau des doses croissantes d'émulsions (de $\frac{1}{10}$ de centimètre cube à $\frac{1}{100.000}$ de cc.).

La virulence des germes capsulés et décapsulés s'est montrée la même.

On pouvait d'ailleurs prévoir ce résultat, car l'injection massive à la souris (péritoine, voie hypodermique) du produit capsulaire isolé pendant l'étude chimique que nous avons exposée plus haut est inoffensive.

CHAPITRE III

HISTORIQUE DES TRAVAUX SUR LES GOMMES MICROBIENNES

L'étude chimique qui précède nous permet d'envisager la question des capsules microbiennes à un tout autre point de vue que celui auquel on le considère habituellement.

Nous avons mis nettement en évidence la nature gommeuse de ce que nous n'appellons plus la « capsule » mais la « substance capsulaire » terme que nous avons choisi pour bien montrer qu'il n'y a pas autour du microbe une coque consistante et faisant corps avec lui, mais seulement un *produit de sécrétion* pouvant prendre les apparences les plus diverses à cause de sa constitution gommeuse, et qui n'est pas nécessaire à la vie du microbe.

Cette constitution spéciale, nous conduit à ne plus considérer la présence de capsules comme un caractère isolé et pour ainsi dire spécifique du groupe de germes dits « encapsulés ». C'est au contraire un cas particulier d'un phénomène général qui est la sécrétion des gommes par un grand nombre de microbes.

Nous allons donc examiner les travaux relatifs aux gommes microbiennes. La littérature qui les con-

cerne est abondante ; aussi n'en noterons-nous que les points les plus importants.

Il faut distinguer deux catégories parmi les germes producteurs de gommes. Les uns tels que le *pneumobacille*, le *Leuconostoc mesenteroides*, l'*Actinobacter polymorphus* (petit bacille capsulé que l'on trouve dans certains laits du Cantal), le *Bacillus lactis aerogenes*, le Pneumocoque, conservent généralement autour du corps microbien, le produit gommeux sous forme d'une enveloppe mucilagineuse plus ou moins nette. Nous avons vu que ce n'était pas là un caractère constant et que cette enveloppe pourrait faire défaut. Les autres ne conservent pas autour du corps microbien le produit formé, mais ils le cèdent de suite au milieu qui devient visqueux, filant.

Le nombre des ferments visqueux est considérable. Quelques-uns s'attaquent à nos boissons et à nos aliments. Ils causent les maladies des vins, des bières, des laits, du pain.

Laurent le premier étudia en 1885 le phénomène dit du « pain filant ». Vogel isola plus tard trois espèces de bacilles qui, transportés sur le pain, le rendaient filant au fur et à mesure qu'ils l'envahissaient. Il les dénomma *Bacillus mesentericus panis viscosi I, II et III*. Juckenack attribue la maladie au *Bacillus mesentericus fuscus* de Flugge.

Les ferments qui s'attaquent au vin commencent par le rendre nuageux ; puis il prend une consistance visqueuse, mucilagineuse qui peut augmenter

jusqu'à rappeler celle de l'albumine. L'organisme incriminé semble être très voisin du *Leuconostoc*. Il possède généralement une enveloppe gommeuse.

Van Laer isole des bières filantes deux bacilles qu'il dénomma *Bacillus viscosus* n° 1 et n° 2.

Krause a décrit un *Bacillus viscosus sacchari* qui transforme rapidement une solution sucrée en une masse visqueuse. Glaser a rencontré et décrit, sous le nom de *B. gelatinosum betæ* une autre espèce qui rend visqueux le jus de betteraves et donne en même temps de l'alcool. Beaucoup de sucres végétaux peuvent subir des transformations analogues. Brautgam a décrit un *Micrococcus gelatinogenus*, qui rend visqueuses les infusions de feuillages de digitale, et qui gélatinise de nombreux jus de fruits en donnant de l'acide lactique. Des mêmes infusions, Ritsert isole son *Bacterium gummosum*. Happ, Héry décrivent à leur tour divers microorganismes susceptibles de rendre visqueuses des solutions sucrées : tels sont le *Bacillus* et le *Micrococcus gummosus*. Enfin Boekhout a montré qu'on pouvait se procurer un grand nombre d'espèces ou de variétés de bacilles producteurs de dextrane en ensemençant sur du bouillon de Loeffler à 20 o/o de saccharose, soit des fleurs, soit des eaux, soit du lait, soit d'autres matériaux exposés à l'air. La liqueur devient visqueuse, et si on en étale une goutte sur de la gélatine de Loeffler à 20 o/o de saccharose, on obtient une foule de colonies gélatineuses peuplées d'une façon variée. La variété qui a été étudiée de préférence par Boeë-

khout est un streptocoque producteur de dextrane, le *streptococcus hornensis*.

Cet exposé succinct permet de nous rendre compte facilement du nombre considérable de ces ferments visqueux. Nous allons maintenant étudier la nature chimique des produits gélatineux auxquels ils donnent naissance.

Etude chimique des produits gommeux fournis par les différents germes

Elle a été entreprise par beaucoup de chercheurs. Certains ont fait une soigneuse détermination des caractères physiques et chimiques des gommés étudiées par eux. Mais il semble que la plupart du temps, tous les soins nécessaires n'ont pas été apportés à la purification du produit obtenu. Il est donc impossible actuellement de faire une classification rigide. La source d'erreur principale est de savoir *si les produits isolés contiennent ou non de l'azote*.

L'emploi d'agents précipitants pour séparer la gomme, favorise l'entraînement des cellules bactériennes et de leur contenu azoté. Or la séparation de ces impuretés est chose extrêmement délicate, en sorte qu'il est difficile de dire si les traces d'azote que l'on décèle finalement proviennent de la gomme elle-même ou des produits d'entraînement qui l'accompagnent. Nous avons, dans le chapitre précédent, insisté longuement sur ce point ; nous avons montré que la gomme du pneumobacille de Friedländer ne

contenait pas d'azote, mais ce résultat n'a été obtenu que grâce à l'emploi d'un minutieux procédé de purification qui nous a seul permis d'éliminer les corps bactériens. Donc, la présence d'azote peut être la source de graves erreurs. Mais cependant, on peut dire qu'après une série de lavages sérieux, un faible pourcentage en azote doit faire supposer une impureté.

a) *Produits visqueux azotés*

Weigmann (1) (1899) montra le premier l'origine bactérienne du petit lait visqueux, mais n'en donna pas la composition, Héry (2) (1891) trouva que le produit visqueux était précipité par l'alcool et plus tard Henzold (3) (1901) dans une recherche minutieuse sur sa nature, démontra qu'il donnait la réaction des protides, contenait 14,41 o/o d'azote et donnait une rotation spécifique de 60°8.

Divers auteurs ont décrit d'autres microorganismes comme agents de la production de petit-lait visqueux, sans déterminer la nature de la matière visqueuse. Il faut citer parmi eux Gruber (1902) (4), Hohl (1902) (5), Harrison et Barlow (1905) (6) Sato

1. Weigmann, *Milchzeitung*. Bd. XVIII, 1889, p. 982.
2. Héry, *Annales de micrographie*, vol. IV, 1891, p. 13.
3. Henzold, *Milchzeitung*. Bd. XXX, 1901, p. 262.
4. Gruber, *Centr. f. Bakt.*, Abt. II. Bd. IX, p. 785, 1902.
5. Hohl, *Centr. f. Bakt.*, Abt. II. Bd. IX, p. 338, 1902.
6. Harrison et Barlow, *Centr. f. Bakt.*, Abt. II. Bd. XV, p. 517, 1905; *Centr. f. Bakt.*, Abt. II. Bd. XIX, p. 264, 1907.

(1907) (1) et Dügge (1907). Il est fort probable que ce matériel visqueux est à rapprocher des mucines décrites par Lepierre (1898) (2) et Rettger (1903) (3) comme produites en plus ou moins grande quantité par toute une variété de microbes.

Elles sont caractérisées comme étant :

1° Précipitées par les acides faibles et insolubles dans l'eau distillée.

2° Solubles dans les solutions alcalines faibles.

3° Décomposées par ébullition avec les acides faibles en un groupement de nature protidique et une substance qui réduit le Fehling.

La présence de cet hydrate de carbone indique que la transition avec les formes qui donnent une gomme sans azote est très possible.

Un produit visqueux d'un caractère un peu particulier a été décrit par Malerba et Sanna Salaris (1888) (4) comme fourni par le *Bacterium gliscrogenum* dans l'urine. Il donnait la réaction des protides. Après précipitation par l'alcool et purification, c'est une substance élastique, blanche, gluante, foncée, fragile lorsque desséchée et soluble dans les acides faibles ; après une longue hydrolyse, elle ne réduit pas le Fehling.

1. Sato, *Centr. f. Bakt.*, Abt. II. Bd. XIX, p. 27, 1907.

2. Lepierre, *Comptes rendus Ac. des Sc.*, 1898, p. 284.

3. Rettger, *Journal of Medical Research.*, vol. X, 1903, p. 101.

4. Malerba et Sanna Salaris, *Ref. Chem. Centralblatt.* Bd. II, 1888, p. 1392.

b) *Produits visqueux non azotés*

Parmi les gommés bactériennes non azotées, on en a décrit un tel nombre qu'il est impossible d'en faire l'énumération.

On peut les classer selon les sucres qu'elles donnent après hydrolyse par les acides faible.

1° *Dextrane*. — La première gomme d'origine bactérienne soigneusement étudiée est celle qui est produite par le *Leuconostoc mesenteroides* lorsqu'il pousse en présence de certains hydrates de carbone. A cause de son importance dans la fabrication du sucre elle a été étudiée plus à fond que les autres.

Scheibler (1874) (1) détermina la formule brute de la gomme et la trouva identique à celle de la cellulose, de l'amidon et de la dextrine.

Il la décrivit comme un anhydride du dextrose et l'appela dextrane.

Sans en signaler la cause spécifique, Jubert (1874) montra que la culture s'arrêtait par addition d'acide phénique. Mendes (1875) signala la ressemblance de cette gomme avec la substance hyaline des Nostocs. Borscow (1876) (2) précisa que le produit était de la pectine et Durin (1876) (3) interprétant faussement le phénomène, dit que le produit formé était de la cellulose provenant de l'action des diastases

1. Scheibler, *Handb. der. techn. Myk.* Bd. 1, p. 230, 1874.

2. Borscow, *Ref. Bot. Jahrb.* Bd. IV, p. 790, 1878.

3. Durin, *Ann. des Sc. Nat. Bot.* Sér. 6, t. III, p. 266, 1877 (*Comptes Rend. Ac. Sc.*, t. LXXXIII, p. 128, 1876).

de la betterave sur le sucre. Van Tieghen (1878) (1) décrit le premier la cause du phénomène et montra (en accord avec l'insolubilité de la gomme dans la solution cupro-ammoniacale) que ce n'était pas de la cellulose. Il montra que la solution sucrée visqueuse contient du dextrane.

Wegner (1890) (2), Liesenberg et Zopf (1892) (3) et Daümichen (4) ont aussi contribué à cette étude. Mais la meilleure description de cette gomme a été donnée par Lippmann (5) (1904). Plusieurs fois purifiée par l'acide chlorhydrique et reprécipitée par l'alcool, elle forme, desséchée, une masse amorphe, blanche, neutre, de formule $C^6H^{10}O^5$. Elle est soluble dans l'eau avec opalescence et est complètement précipitée par l'alcool éthylique (incomplètement par l'alcool méthylique) sous forme d'une masse élastique insoluble dans la liqueur de Schweitzer.

Divers auteurs donnent pour pouvoir rotatoire spécifique $\alpha_D = +195$. Le dextrane est soluble dans l'acide sulfurique concentré à froid et dans l'acide sulfurique étendu à chaud. Par hydrolyse, il donne de la dextrine puis du glucose.

1. Van Tieghem, *Ann. des Sc. Nat. Bot.* Sér. 6, t. VII, p. 180, 1878.

2. Wegner, *Zeitscher. d. Ver. f. Rübenzuckerindustrie*. Bd. XL, p. 789, 1890.

3. Liesenberg et Zopf, *Zopfs Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer organismen*. Bd. 1, p. 1, 1892.

4. Daümichen, *Zeitschr. d. Ver. d. Deutschen Zucker Industrie*. Bd. XL, p. 701.

5. Lippmann, *Chemie der Zuckerarten*, 3. Aufl, 1904.

Beaucoup d'autres organismes sont reconnus comme donnant du dextrane. Pasteur (1861) montra le premier que la fermentation visqueuse des solutions hydrocarbonées est d'origine microbienne et que le produit formé est une gomme à laquelle il donne la formule $C^{12}H^{20}O^{10}$. Monoyer (1862) revisa les équations de Pasteur et Baudrimont (1875) (1) conclut que dans la fermentation des solutions sucrées, le sucre lui-même n'était pas utilisé.

Béchamp (1881) (2) décrit sous le nom de viscosse une gomme produite par le *Micrococcus viscosus* à partir des solutions de sucre de canne. Par ses propriétés (précipitation par l'alcool, solubilité, pouvoir rotatoire, pouvoir réducteur après longue hydrolyse) elle ressemble au dextrane de Scheibler et fut considérée comme identique.

Il est probable que la gomme produite par les *Micrococcus viscosus I et II* de Van Laer (3) (1889) est d'une nature analogue quoique l'un des constituants fut trouvé être azoté.

On peut dire la même chose du *Bacillus viscosus vini* et du *Bacillus viscosus sacchari* décrit par Kramer (1889).

Braütigam (1891) (4) et Ritsert (1891) (5) montrè-

1. Baudrimont, *Comptes rend. Ac. des Sc.*, t. LXXX, p. 1253, 1875.

2. Béchamp, *Comptes rend. Ac. d. Sc.*, t. XCIII, p. 78, 1881.

3. Van Laer, Mémoires couronnés et autres mémoires publiés par l'Académie royale de Belgique, t. XLIII, 1889; *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIV, p. 82, 1900.

4. Braütigam, *Ref. Chem. Central.* Bd. II, p. 648, 1891.

5. Ritsert, *Ref. Chem. Central.* Bd. LXIII, p. 236, 1891.

rent que la production de dextrane par le *Micrococcus gelatigenosus* était indépendante des substances albuminoïdes du milieu.

D'autres bactéries sont encore considérées comme produisant du dextrane. Il faut citer parmi elles le *Bacterium gelatigenosum betæ* (Glaser, 1885) (1), le *Clostridium gelatigenosum* (Laxa) (2), le *Bacillus gummosus* et le *Micrococcus gummosus* (Happ, 1893) (3), le *Bacillus viscosus III* (Vandam, 1896) (4), le *Micrococcus viscosus* (Orth 1899) (5), le *Streptococcus hornensis* (Boeekhout, 1900) (6), le *Bacillus panis viscosus* (Tillmanns, 1902). Signalons pour terminer la sécrétion de dextrane par le *Bacillus radicola* démontrée par Buchanan (1909) (7) et plus récemment par Kramar (1922) (8).

2° *Lévulane*. — Laxa trouva le premier qu'un hydrate de carbone hydrolysable en d-fructose était produit par une variété de *Clostridium gelatigenosum* et ces résultats furent vérifiés par Stift. Maassen (1905) (9) attribua au *Semi-clostridium commune*

1. Glaser, *Chem. Zeitung*. Bd. XIX, p. 1704, 1895.

2. Laxa, *Zeitschr. f. Zuckerindustrie in Böhmen*. Bd. XXIV, p. 423.

3. Happ, *Ref. Centr. f. Bakter. Abt. II*. Bd. XIV, p. 175, 1893.

4. Vandam, *Bulletin de l'Association belge de Chimie*, t. IX, p. 245, 1896.

5. Orth, *Bulletin de l'Assoc. de Chimie*, t. XVII, p. 30, 1899.

6. Boeekhout, *Centralb. f. Bakt. Abt. III*. Bd. IV, p. 161, 1900.

7. Buchanan, *Centr. f. Bakter. (Chimie)*, t. XXII, 3^e partie, p. 372, 1909.

8. Kramar, *Centr. f. Bakter. Orig.*, t. LXXXVII, p. 401, 1922.

9. Maassen, *Arb. d. Bakter. Abt. d. Kaiserl. Ges. Amst.* Bd. V, p. 1. 1905.

la formation dans les solutions sucrées de masses gommeuses analogues à celles du leuconostoc. Trois autres espèces de clostridium qu'il isola de sources diverses possédaient ainsi que le *semi-clostridium commune* le pouvoir de former du lévulane.

Le levulane est décrit par Lippmann (1904) comme soluble à chaud dans le lait de chaux. Fraichement précipité et déshydraté par l'alcool il donne une masse blanche amorphe très hygroscopique. Dans ces conditions elle n'est pas soluble dans l'eau froide, mais seulement dans l'eau chaude ; 0 gr. 50 dissous dans 100 grammes de liquide suffisent pour que la solution se prenne en masse par refroidissement. Le produit décrit par Lippmann, précipite en solution par l'acétate basique de plomb. Il ne réduit le Fehling qu'après hydrolyse, par suite de la formation de lévulose d.

Le produit décrit par Greig Smith (1906) (1) comme fourni par le *Bacillus lævaniformans* ressemble au précédent, car il est aussi hydrolysé en d-fructose, mais il en diffère par son point de fusion et son pouvoir rotatoire. Il ne réduit pas le Fehling. La solution gommeuse est précipitée par l'alcool, par l'acétate de plomb ammoniacal, par l'eau de strontiane et par l'eau de baryte.

3° *Galactane*. — Schmit Mulheim (1883) trouva qu'un streptocoque isolé par lui du lait visqueux ne

1. Greig Smith, *Centr. f. Bakt. Abt.*, II, Bd. XV, p. 380, 1905 ; *id.*, II, Bd. X. p. 60 ; *id.*, II, Bd. XI, p. 698, 1905 ; *id.*, II, Bd. XV, p. 793, 1905.

produisait de gomme qu'en présence de sucre. La précipitation par l'alcool formait un précipité blanc fibreux, léger, élastique, peu soluble dans l'eau froide, mais soluble dans l'eau chaude en donnant une solution opalescente. Le viscose produit par le microbe de Hueppe (1884) (1) est probablement d'une nature analogue. On peut en dire autant du microbe de Leichmann (1894). Emmerling (1900) (2) trouva que la gomme produite par le *Bacillus lactis aerogenes* dans le lait est précipitable par l'alcool. Desséchée, c'est une poudre blanche, insoluble dans l'eau. Elle ne réduit le Fehling qu'après hydrolyse, et donne de l'acide mucique par oxydation au moyen de l'acide nitrique. Schardinger (1902) travaillant avec une variété de *B. lactis aerogenes*, détermina que la formule de la gomme était $C^6H^{10}O^5$. La solution soigneusement préparée est libre d'azote. La gomme gonfle dans l'eau et se dissout par agitation en donnant une solution claire, gélatineuse. Elle est optiquement inactive, et ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse par les acides dilués à chaud. Par oxydation nitrique, il se forme un mélange d'acide oxalique et d'acide mucique. Schardinger en conclut que la substance est un arabo-galactane.

Greig Smith en 1905 a décrit deux organismes : le *Bacterium atherstonei* qui produit du galactane et le *Bacterium pseudo-arabinum* qui produit une gomme

1. Hueppe, *Deutsche Med. Wochens.* Bd. X, p. 777, 1884.

2. Emmerling, *Ber. d. D. Chem. Ges.* Bd. XXXIII, p. 2477, 1900.

analogue à la gomme arabique et s'hydrolysant en galactose.

La gomme produite par le *Bacillus spongiosus* (Ruhland, 1906) est un arabane pur, sans galactane. Enfin les recherches de Tœnniessen et les nôtres ont démontré que la substance capsulaire du pneumo-bacille de Friedlænder était formée de galactane.

Origine morphologique des gommes microbiennes

Les auteurs ont formulé diverses théories sur la production de ces gommes. Elles ont été souvent décrites comme étant le résultat d'une véritable fermentation des hydrates de carbone par les bactéries. Béchamp (1881), Ritsert (1891) et Braütigam (1891), conclurent que c'était bien là l'origine de la gomme, dans beaucoup de cas tout au moins. Leichmann (1894), ne put voir aucun gonflement de la membrane cellulaire dans le microbe étudié par lui, et cependant il est décrit comme produisant une véritable fermentation visqueuse du sucre. Duclaux (1901), émet l'opinion que la formation de la gomme résulte d'un véritable processus synthétique. Le ferment n'est pas forcément extra-cellulaire, une partie du produit formé étant directement utilisée par l'organisme. Il y a simultanément analyse et synthèse.

Cette hypothèse permettrait d'envisager la capsule à la fois comme produit de sécrétion et comme matière de réserve. Ceci aiderait à expliquer la dispari-

tion des capsules dans les vieilles cultures alors que le germe demeure vivant. Les races dépourvues de capsule par suite de repiquages successifs sur les milieux artificiels (voir ch. II, p. 69), seraient des races fatiguées, tout au plus capables d'assimiler le minimum de matériaux nutritifs nécessaires à l'entretien de leur vitalité, mais impuissantes à former un matériel de réserve. Cela concorderait avec le fait que la substance capsulaire constitue pour le pneumobacille de Friedländer un excellent milieu de culture.

Les gommés et les produits visqueux ont été généralement considérés comme le résultat du gonflement puis de la dissolution dans l'eau des membranes cellulaires.

Chez le *Bacillus viscosus I* et le *B. viscosus II*, van Laer (1889), supposa que la gomme provenait du gonflement d'un constituant hydrocarboné. Kramer (1889), arriva aux mêmes conclusions en étudiant le *Bacillus viscosus sacchari*. Ratz (1890), nota la présence d'une capsule faiblement colorable, autour du coccus causant le lait visqueux Héry (1891), à propos d'un organisme similaire et Adametz à propos du *B. lactis viscosus* signalèrent la dissolution des capsules. Ward (1892), démontra la relation causale existant entre la capsule du *Bacterium vermiforme* et la viscosité développée dans la bière de gingembre. Kapp (1893), insiste sur l'impossibilité de polymérisation extra-cellulaire du sucre pour former une gomme, et pense que la formation de

cette dernière est due (dans le cas de liquides visqueux) à la dissolution de la capsule. Le *Bacillus viscosus* III, de Vandam (1896), le *Micrococcus viscosus* de Orth (1899), la Bactérie du sucre de Ward et Green, le *Bacillus lactis aerogenes* de Schardinger (1902), le *B. viscofucatum* de Harrison et Barlow (1905), le *Semi-clostridium commune* de Maassen ont tous été décrits comme donnant naissance à une fermentation visqueuse ou à une production de gomme par dissolution des capsules. Le pneumobacille de Friedlænder se conforme comme nous l'avons vu à cette règle générale. Dépourvu de capsule par macération dans l'eau et transporté sur un milieu nutritif convenable, il s'entoure à nouveau d'une capsule d'épaisseur variable et dépassant de beaucoup en volume la cellule elle-même.

Au début de la culture, les capsules sont tout à fait distinctes, mais elles perdent peu à peu leur contour défini et deviennent coalescentes, si bien qu'au bout d'un certain temps, tous les organismes sont englobés dans une commune masse muqueuse. On assiste ensuite à la dissolution de la partie externe de la capsule, en même temps que le germe forme du galactane à sa partie interne, de sorte qu'il y a un courant continu de galactane de l'intérieur à l'extérieur. Il est vraisemblable que les matériaux élaborés par le contenu protoplasmique sont constamment incorporés au contenu de la membrane cellulaire.

Il y a transport vers l'extérieur et à travers la

membrane, de ces matériaux. *La capsule s'accroît par interpolation.*

Si le produit secrété est capable de se gonfler dans l'eau, il se développe alors une capsule bien définie, et s'il est soluble dans l'eau, de suite ou après un certain temps, il se forme une solution visqueuse. L'opinion que la membrane est azotée n'est pas contraire à l'idée d'une constitution exclusivement hydro-carbonée de la capsule. En effet, Van Laer a montré que la membrane des organismes qu'il étudiait était azotée, mais que le produit de sécrétion était uniquement un hydrate de carbone.

Toutes les considérations qui précèdent nous conduisent alors à envisager la capsule comme formée de couches concentriques, les plus internes riches en galactane et pauvres en eau, les plus externes, au contraire, pauvres en galactane et riches en eau. On s'explique ainsi l'inutilité de supposer une membrane péricapsulaire.

En résumé, *c'est à un point de vue dynamique qu'il faut envisager la capsule et non à un point de vue statique.*

Cette étude envisagée à son double point de vue, histologique et biologique, nous permet de faire disparaître la cloison qui existe entre les germes dits « capsulés » (dont les deux principaux sont le pneumobacille et le pneumocoque) et les autres. Le phénomène de production des gommages est un phénomène très général (nous avons vu qu'il est

vraisemblable que la capsule du pneumocoque a aussi une constitution gommeuse).

Il faut d'ailleurs se féliciter de la suppression de cette barrière, car : « le monde dans lequel nous « vivons ne sera bien connu que lorsque les classifica- « tions en auront disparu. La science s'emploie main- « tenant à disséquer la cellule, comme elle s'est appli- « quée jusqu'ici à disséquer les ensembles cellulaires, « et il ne faut pas être plus surpris qu'elle rencontre « dans diverses cellules les mêmes fonctions, qu'on ne « l'est de trouver le même système nerveux ou mus- « culaire dans des animaux très divers » (Duclaux).

Si nous voulons classer les différents organismes d'après leur faculté de produire des gommes à partir des substances sucrées diverses, nous obtenons le tableau suivant :

A partir du glucose :

Micrococcus viscosus (Pasteur, 1861).

Bacillus viscosus bruxellensis (Van Laer, 1900).

Bacillus viscosus vini (Kramer, 1889).

Bacillus polymyxa et *B. tumescens* (Zopf).

Bactérium pediculatum (Koch et Hosaëus, 1894).

Leuconostoc dissiliens (Pitoy).

Leuconostoc mesenteroïdes (Van Tieghem, 1878).

Leuconostoc indicum (Liesenberg et Zopf, 1892).

Pneumobacille de Friedländer.

Pneumocoque vraisemblablement.

A partir du lévulose :

Bacillus spongiosus (Ruhland, 1906).

Bacterium acaciæ (Smith, 1905).

Une variété de *Bacillus viscosus* (Delafond, 1898).

A partir du saccharose :

Leuconostoc mesenteroides (Van Tieghem, 1878).

Bacillus viscosus sacchari (Kramer, 1889).

Microc. gelatigenosus (Braütigam, 1891).

B. gummosus (Happ, 1894).

Bact. gummosum (Ritsert, 1891).

Microc. viscosus (Orth., 1899).

Bact. gelatigenosum betæ (Glaser, 1905).

Clostridium gelatigenosum (Laxa).

Streptococcus hornensis (Bgeekhout, 1900).

Strept. aller et strep. opalinitza (Zett, nov. 1907).

B. panificans (Van Laer, 1885).

Bact. vermiforme (Ward, 1892).

Semi-clostridium commune (Maassen, 1905).

A partir du maltose :

B. viscosus I et IV (Van Laer, 1898).

B. gelatigenosus betæ (Glaser, 1895).

Le leuconostoc mesenteroides ne produit pas de gomme à partir du maltose (Liesenberg et Zopf, 1892).

A partir du lactose :

Micrococcus (Schmidt-Mülheim, 1883).

B. viscosus I et II (Van Laer, 1889).

M. gummosus (Happ, 1894).

Bact. lactis longae (Peterson, 1900).

Coccus lactis viscosi (Gruber, 1903).

B. Lactorubefaciens et *Carphococcus pituitocarpus* (Hohl, 1902).

A partir du raffinose et de la mannite :

Bacillus spongiosus (Ruhland, 1906).

CHAPITRE IV

ÉTUDE DES PROCÉDÉS DE COLORATION DES CAPSULES MICROBIENNES

INTRODUCTION

Nous allons dans ce chapitre, passer en revue toutes les méthodes préconisées pour colorer les capsules microbiennes.

Les procédés de coloration sont si nombreux que nous avons été conduit à rechercher le procédé de choix ; en même temps nous avons essayé de comprendre pourquoi échouaient les autres.

La plus grande partie de notre travail exposée dans les précédents chapitres, porte principalement sur le pneumobacille de Friedländer. Mais la plupart des procédés ont été proposés pour tous les germes encapsulés, si bien que nous devons logiquement ne pas limiter notre étude au seul pneumobacille.

Le fait qu'il existe une même méthode de coloration pour plusieurs germes encapsulés indique nettement que les auteurs ne faisaient pas entrer en ligne de compte la composition chimique des cap-

sules. Or il n'est pas évident qu'elle est la même pour tous les germes (1).

Le nombre considérable des méthodes préconisées (trente) pour colorer les capsules, témoigne de leurs imperfections.

Les diverses méthodes peuvent se classer en deux catégories selon qu'elles emploient ou non un produit de nature albuminoïde, tel que le liquide d'ascite, le sérum humain ou animal, l'ovalbumine, etc...

MÉTHODES N'UTILISANT PAS D'ALBUMINE

Faisons une remarque préliminaire. Nous appliquerons les techniques de ce groupe à la coloration des capsules provenant de microbes cultivés en milieux liquides non albumineux. On conçoit facilement que si nous nous adressons à une culture en sérum de lapin, en bouillon-sérum, ou à un exsudat pathologique, nous retombons dans la deuxième catégorie de méthodes, c'est-à-dire dans les méthodes à albumine. D'autre part, il est utile de remarquer que ces méthodes prétendent à tort colorer les capsules. Elles les font seulement ressortir en capsules dites *négatives*.

Tous les auteurs qui préconisent les méthodes de ce groupe partaient de l'idée que la capsule était formée d'une matière albuminoïde. Certains même, à cause du caractère visqueux des cultures sur mi-

1. Voir à ce sujet la note de la page 51 du chapitre premier.

lieux solides l'identifiaient à la mucine (Heim, Friedländer). Aussi ne faut-il pas s'étonner que les fixateurs employés par ces auteurs soient uniquement des fixateurs d'albuminoïdes. Beaucoup même ne spécifient pas dans leur technique, la méthode de fixation qu'ils emploient. Ils sous entendent vraisemblablement qu'il suffit de fixer les préparations par les moyens usuels (chaleur, alcool, éther, etc...).

Fixation des capsules dans les méthodes n'utilisant pas d'albumine

Sur dix-huit méthodes examinées, deux seulement (celles de Matteo Carpano et de Kayser), évitent la dessiccation. Dans les seize autres, on dessèche le frottis après étalement, puis on fixe, soit par la chaleur, soit par le sublimé, l'alcool-éther, l'acide acétique, etc...

Or nous avons vu précédemment (chap. I) que la dessiccation a un effet des plus nuisibles sur les capsules. L'eau qu'elles contiennent en très forte quantité s'évapore et il ne reste plus que la substance primitivement en suspension qui se dépose autour de la membrane cellulaire, et que l'on considère à tort comme une capsule. A ce propos, il faut bien remarquer et nous avons déjà insisté là-dessus (voir chap. I, p. 49), que la membrane cellulaire qui sépare le corps microbien de la capsule peut avoir des dimensions considérables.

Arrêtons-nous un instant sur ce point. Nous

A) Méthodes n'utilisant pas d'albumine (1)

AUTEUR	FIXATEURS employés	COLORANT EMPLOYÉ	PARTICULARITÉS de la méthode
<i>Johne</i>	Non spécifié.	Solution aq. à 2 o/o de violet de méthyle ou de violet de gen- tiane.	Différenciation par l'acide acétique à 1 ou 2 o/o. Examen dans l'eau.
<i>Klett</i>	Non spécifié.	Solution hydroal- coolique de bleu de méthylène et solu- tion de fuchsine de même concentration.	On fait agir le bleu de méthy- lène à chaud. Examen dans l'eau.
<i>Friedländer</i> a) Frottis	Dessiccation, puis acide acéti- que à 10 o/o.	Solution de violet de gentiane dans l'eau d'aniline.	
b) Coupe :	Acide acéti- que.	Solution : Solution al- coolique de vio- let de gentiane. 50 ^{cc} Acide acéti- que 10 ^{gr} Eau distillée. 100 ^{gr}	
<i>Guarnieri</i>	Dessiccation. Chaleur.	Solution de violet de gentiane aniliné...	Différenciation par le chl- rure de sodium à 2 o/o. Examen dans le baume du Canada.
<i>Ribbert</i>	Non spécifié.	Liquide d'Ehrlich : Eau 100 ^{gr} Alcool 50 ^{gr} Acide acét... 12 ^{gr} 5 Dahlia qsp. satur. à chaud.	Préconisé tout d'abord pour le pneumocoque (1885).
<i>Mac Conkey</i>	Non spécifié.	Dahlia 0 ^{gr} 50 Vert de mé- thyle 1 ^{gr} 50 Solut. alcal. saturée de fuchsine.... 10 ^{gr} Eau 200 ^{gr}	
<i>Matteo Carpano</i>	Pas de dessic- cation ; vapeurs osmiques.	Ziehl ou solution sa- turée de cristal violet ou solution de gen- tiane.	Pour éviter la dessiccation, l'auteur opère l'étalement de son frottis dans de la buée de vapeur d'eau. La coloration se fait à chaud.
<i>Cornil et Alvarez</i>	Non spécifié.	Gram, puis solution saturée de safranine.	Préconisé tout d'abord (1885), pour le bacille du rhinosclé- rome.

1. Voir la bibliographie à la fin de ce travail.

AUTEUR	FIXATEURS employés	COLORANT EMPLOYÉ	PARTICULARITÉS de la méthode
<i>Thost</i>	Non spécifié.	Liquide de Ziehl à chaud, puis décoloration par acide acétique et coloration finale au bleu de méthylène à 10 o/o.	Préconisé tout d'abord (1886) pour le pneumocoque V. Ermengem remplace le bleu par la nigrosine.
<i>Paltauf et Eiselsberg</i>	Non spécifié.	Violet de gentiane aniliné, puis décoloration légère par alcool ou acide acétique ; liquide d'Ehrlich, puis solution de Lugol et coloration finale par safranine.	Préconisé tout d'abord (1886), pour le bacille de rhino-sclérome.
<i>Loeffler</i>	Dessiccation, chaleur.	Frottis à l'encre de Chine, puis bleu de méthylène.	
<i>Faulhaber</i>	Non spécifié.	Bleu aniliné alcalin de Loeffler.	
<i>Roux</i>	Dessiccation, alcool-éther.	Violet de gentiane aniliné ou bleu de Loeffler, puis violet de gentiane aniliné.	
<i>Hardouin</i>	Dessiccation, chaleur ou mieux alcool enflammé sur frottis à l'encre de Chine.	Encre de Chine, puis bleu de méthylène ou bleu de toluidine (2 à 3 secondes), Lavage à l'alcool et xylol.	
<i>Kayser</i>	Préparation non desséchée, vapeurs osmiq.		
<i>Van Riemsdijk</i>	Coloration à l'état frais.	On dissocie la culture dans une suspension de protargol et dans une solution alcaline d'éosine, puis on étale sur lame et on sèche à l'air.	
<i>Malone</i>	Dessiccation, chaleur ou alcool-éther.	Double coloration avec solution aq. à 2 o/o de rouge Congo et solution aq. de violet de méthyle à 0,50 o/o avec une différenciation par une solution alcoolique d'acide chlorhydrique.	
<i>Richard Mins</i>	Dessiccation, solution saturée de sublimé.	Faire un Gram à chaud en décolorant tour à tour par l'alcool méthylique et l'essence de girofle. Mor-dançage avec une solution de tannin, de sublimé et d'alun, puis coloration par l'éosine. Lavage à la solution d'alun, à l'alcool, au xylol, puis montage au baume.	

sommes convaincu que trop souvent cette membrane non colorable par les colorants usuels, si développée chez beaucoup de pneumocoques (mais présente chez tous les germes) a souvent été confondue avec la vraie capsule. Son manque d'affinité pour les matières colorantes la fait paraître dans les préparations colorées comme une auréole autour du corps microbien ; aussi la confond-on souvent avec une capsule. Nous avons obtenu fréquemment des préparations où il y avait une mince auréole autour de diplocoques, alors que l'examen à l'encre de Chine ne décelait aucune capsule. Pour le pneumocoque en particulier la remarque est importante, car là surtout il y a sujet à confusions.

Le premier point à observer avec soin lorsque l'on veut colorer la capsule, c'est de la préserver de toute dessiccation. Nous ne pouvons que répéter à ce sujet les observations déjà faites au chapitre premier lors de l'étude de la méthode à l'encre de Chine.

La technique de fixation par la chaleur est encore moins défendable que la dessiccation. On conçoit aisément qu'exposer à une haute température une substance aussi fragile que la substance capsulaire, c'est en altérer irrémédiablement l'image. A plus forte raison lorsqu'on fixe la préparation en y versant quelques gouttes d'alcool que l'on enflamme (méthode Hardouin).

Tous les autres fixateurs employés sont fixateurs d'albuminoïdes et non de produits hydrocarbonés comme la capsule. L'acide acétique a été préconisé

par Friedlænder qui supposait la capsule formée de mucine. On a aussi employé les vapeurs osmiques et le sublimé. Ils ne fixent pas la capsule, puisque nous verrons que les images obtenues ne montrent que des capsules en négatif.

L'étude critique des méthodes est facilitée par l'examen comparatif des capsules à la méthode à l'encre de Chine qui constitue une véritable pierre de touche. On s'aperçoit ainsi que l'emploi de fixateurs tels que le sublimé, l'acide acétique, l'acide osmique altèrent gravement la forme et les dimensions de la capsule. Un pneumobacille à substance capsulaire bien développée la montre rétractée et déformée par l'usage de l'un quelconque des fixateurs précités.

Les critiques qui précèdent seraient suffisantes pour nous faire rejeter *a priori* comme imparfaites toutes les méthodes dans lesquelles interviennent dessiccation ou chauffage. Ces méthodes sont cependant en si grand nombre qu'il est curieux de voir ce que les auteurs considéraient comme capsule alors que les méthodes qu'ils préconisent les altèrent infailliblement. Dans tous les cas, le corps microbien central est fortement coloré. Sa nature albuminoïde explique sa fixation parfaite par la chaleur ou par les fixateurs employés. Autour de lui se trouve une aire incolore que l'on dit être la capsule, puis un fond plus ou moins coloré. Cette zone claire appelée faussement capsule en négatif correspond selon les auteurs à la capsule véritable. Or, cela est faux. La

zone claire représente l'ensemble membrane cellulaire et produit d'évaporation de la capsule.

Cependant, on remarque fréquemment dans de telles préparations, autour de la prétendue capsule, un trait coloré d'épaisseur variable. Il représente une portion de substance capsulaire qui a pris le colorant.

Nous voici donc amenés à la question de la coloration de la substance capsulaire.

La coloration de la substance capsulaire

Si l'on applique toutes les méthodes de coloration indiquées au tableau A à la mise en évidence des capsules *dans les cultures liquides non albumineuses*, on n'arrive jamais à colorer la capsule. On obtient seulement une auréole incolore autour d'un corps microbien fortement coloré, et très souvent une ligne externe irrégulièrement épaisse et colorée de façon plus ou moins intense.

La substance capsulaire est-elle colorable ? A quoi correspond la ligne externe ?

« Rendre la capsule colorable est un problème », disait Rosenow.

Prenons un exemple. La capsule du pneumobacille de Friedländer est formée d'environ 8 o/o de galactane et de 92 o/o d'eau. Or le galactane est colorable.

Étalons sur lame, une anse de platine d'une culture de pneumobacille sur gélose, et desséchons. Colorons ensuite soit par le bleu de méthylène, soit

par la fuchsine, etc. La préparation obtenue nous montre une grande quantité de corps microbiens entourés de leur membrane incolore, et réunis les uns aux autres par des filaments enchevêtrés qui sont des traînées de substance capsulaire desséchée. Ces filaments ont pris le colorant. Par conséquent le produit en solution dans la capsule est colorable. Mais il n'est pas là à l'état où il se trouve dans la capsule. Il est débarrassé de 92 o/o d'eau. En présence de cette énorme quantité de liquide est-il encore colorable ?

Il existe un moyen de nous en assurer.

Puisque la technique à l'encre de Chine nous permet d'obtenir des préparations à l'état frais, sans que la capsule subisse la moindre altération, nous allons essayer de la colorer dans ces conditions. Il suffit, pour cela, de mélanger avant l'étalement une goutte d'encre de Chine et une goutte d'une solution concentrée d'un colorant quelconque. Les essais que nous avons ainsi faits ne nous ont jamais permis de colorer la capsule. Nous avons essayé d'employer les colorants des gommes proposés par Lutz (1) et en particulier sa solution hydro-alcoolique de rouge neutre de Casella. Cela ne nous a donné aucun résultat. D'ailleurs, ces colorants ne conviennent qu'après coagulation de la gomme. Ainsi, pour la coloration des mucilages, Lutz indique de les traiter

1. Lutz, *Contribution à l'étude chimique et botanique des gommes*. Thèse pour l'obtention du dipl. de pharm. de 1^{re} classe, 27 juin 1895.

préalablement par l'acétate mercurique qui les précipite. Mais si nous essayons les agents coagulants sur la capsule à l'état frais, on voit le galactane se précipiter autour du corps microbien. A cet état le produit est colorable, mais la morphologie de la capsule est altérée. Signalons enfin qu'un changement de la réaction du milieu dans lequel on opère, ne permet pas non plus la coloration de la gomme.

Nous en concluons donc que la substance capsulaire n'est pas colorable, car si elle est formée par un produit colorable lui-même, celui-ci est trop dilué dans l'eau pour prendre les colorants sans fixation préalable. D'autre part les agents fixateurs proposés sont des composés qui ne fixent pas la capsule ou qui précipitent la substance capsulaire, c'est-à-dire détruisent l'image.

Cela nous permet d'expliquer la présence de la zone externe colorée dont nous avons parlé plus haut.

Celle-ci résulte de la coloration du dépôt irrégulier de galactane autour du microbe.

Examinons maintenant les méthodes de Matteo Carpano et de Kayser qui évitent toute dessiccation.

Pour éviter l'évaporation de l'eau du contenu capsulaire, Matteo Carpano procède à l'étalement du frottis au-dessus d'un récipient contenant de l'eau bouillante. Effectivement la vapeur d'eau prévient toute dessiccation, mais le fixateur employé ensuite (l'acide osmique) ne fixe pas la capsule, et le résultat final n'est pas meilleur.

Mêmes observations pour la méthode de Kayser dont le principe est le même que la méthode de Carpano. On expose aux vapeurs osmiques la préparation encore humide, sans employer la vapeur d'eau. Les capsules sont altérées quand même.

Remarquons pour terminer qu'aucun des auteurs n'a porté son attention sur la fixation. C'est la coloration qui les retient au contraire. Le tableau A nous montre toute une série de formules, présentant diverses combinaisons de colorants. Ce qui manque, ce n'est pas un bon colorant, mais un bon fixateur.

Voici les conclusions que nous pouvons tirer de l'examen de toutes les méthodes de coloration sans albumine :

Ces méthodes sont mauvaises. Elles ne colorent pas la substance capsulaire parce que celle-ci n'est pas fixée par les agents ordinairement utilisés. Seule la dessiccation, ou la précipitation par certains agents coagulants permettent sa coloration. Mais ils détruisent la morphologie de la capsule.

En quelques mots : *il y a trop peu de gomme dans les capsules pour qu'on puisse les colorer.*

MÉTHODES UTILISANT UNE ALBUMINE

Toutes les méthodes que nous allons maintenant examiner et dont le tableau B donne les principales caractéristiques, présentent un point commun. C'est l'emploi d'un produit de nature albuminoïde (sérum,

liq. d'ascite, caséinate de soude, ovalbumine) que l'on mélange à la préparation avant l'étalement.

Une remarque générale : on arrive avec les meilleures de ces méthodes à montrer des capsules microbiennes bien différentes de celles que l'on peut voir avec les méthodes précédentes. L'image obtenue égale même parfois en dimensions les images fournies par l'encre de Chine.

Nous étudierons plus loin le mécanisme de la coloration et l'influence capitale de l'albumine introduite artificiellement.

Tout d'abord examinons les résultats que nous donnent les différentes méthodes.

Les procédés diffèrent, en premier lieu, par l'agent fixateur employé : chaleur après dessiccation (méthodes de Hiss, Boni, Epstein, Huntoon) acide acétique après dessiccation (Welch) formol après dessiccation (Wadsworth) sublimé après dessiccation (Médalia). Emploi de fixateurs divers, sans dessiccation préalable : tanin (Rosenow) acide phosphomolybdique (Smith) vapeurs osmiques (Weidenreich et Hamm) solution de Zenker sans acide acétique (Buerger).

Fixation de la capsule dans les méthodes utilisant une albumine

On pouvait prévoir que la dessiccation de la préparation avant fixation détruirait plus ou moins la capsule. La coloration consécutive montre une

rétraction de la substance capsulaire. C'est là un des inconvénients des méthodes de Hiss, Boni, Welch, etc... Pareil reproche ne peut être adressé aux méthodes de Rosenow, de Weidenreich, de Buerger, de Smith, et leur emploi permet d'obtenir des capsules larges et mieux conservées.

En vérité toutes les méthodes altèrent la capsule, *mais c'est une question de degré*, et l'avantage revient aux méthodes qui utilisent l'albumine (nous verrons plus loin pourquoi). Effectivement de belles capsules peuvent être obtenues par les méthodes de Welch, Hiss, et Wadsworth, mais dans ce cas, les méthodes sans dessiccation et la méthode à l'encre de Chine à l'état frais montrent des capsules beaucoup plus larges et beaucoup plus belles. Naturellement, lorsque les méthodes sans dessiccation ne montrent que de petites capsules, les autres n'en montrent pas du tout. En d'autres termes, la dessiccation dans un but de fixation est déjà un facteur important lorsque les capsules sont bien développées, à plus forte raison lorsqu'elles le sont mal.

On peut, en insistant davantage, faire sur l'emploi de la chaleur comme agent de fixation, les mêmes observations que pour la dessiccation. Cependant, là encore, on constate que la capsule, quoique très altérée, l'est cependant moins qu'avec les méthodes sans albumine. Mais, les méthodes ne faisant intervenir ni dessiccation, ni chauffage se montrent très nettement supérieures aux autres.

B. — Méthodes employant une albumine (1)

AUTEURS	FIXATEURS employés	COLORANT EMPLOYÉ	PARTICULARITÉS de la méthode
<i>Rosenow</i> (v. détails p. 111).	Sol. de tannin à 5 o/o.	Violet de gentiane aniliné à chaud, puis solution de Lugol. Dé- coloration par l'alcool et coloration du fond à l'éosine.	Sérum quelconque. La fixation au tannin a lieu lorsque les bords de la prépa- ration commencent à se dessé- cher.
<i>Medalia</i>	Solut. aqueuse de sublimé.	Bleu de méthylène à 10 o/o alcalinisé par du carbonate de soude à 2 o/o.	Sérum quel- conque... } à parties égales Eau..... } ou liquide d'ascite. Dessiccation de la prépara- tion.
<i>Hiss</i> N° 1	Dessiccation et chaleur.	Solution aq. sat. de violet de gentiane ou fuch sine à chaud (1 se- conde) puis lavage avec sol. aq. de SO ⁴ Cu à 1/5.	Sérum quelconque ou liquide d'ascite, dessiccation et fixation par chaleur. Préparation, monter au baume.
N° 2	Dessiccation et chaleur.	Sol. aq. 1/2 sat. de violet de gentiane. Lavage avec une sol. aq. de carbonate de potasse à 0,25 o/o.	Sérum ou liquide d'ascite. Dessiccation. Luter avec vase- line.
<i>Boni</i>	Dessiccation et chaleur.	Bleu de Lœffler Fuch sine ou violet de gentiane.	Emploi d'un mélange d'al- bumine d'œuf, de glycérine et de formol.
<i>Smith</i>	Solut. d'acide phosphomolybdi- que.	Violet de gentiane aniliné à chaud puis Lugol, alcool et fond à l'éosine.	Sérum ou liquide d'ascite. On fixe à l'acide phosphomo- lybdique avant dessiccation.
<i>Welch</i>	Dessiccation et chaleur.	Acide acétique comme mordant. Co- loration et lavage avec sol. aq. de violet de gentiane aniliné. La- vage, fixation et exa- men dans une solution saline à 2 o/o.	Sérum ou liquide d'ascite.
<i>Hamm</i> (reprise par Legroux)	Vapeurs osmi- ques et alcool absolu.	Coloration par le R o m a n o w s k y à chaud.	On traite préalablement la lame seule par les vapeurs os- miques. Puis on fait l'éta- lement. On ajoute du sérum si le germe provient d'une culture sur gélose ou dans le bouillon.

1. Voir la bibliographie à la fin de ce travail.

AUTEURS	FIXATEURS employés	COLORANT EMPLOYÉ	PARTICULARITÉS de la méthode
<i>Weidenreich</i>	Vapeurs osmiques.	Coloration par le Giemsa à chaud.	Serum ou liquide d'ascite.
<i>Wadsworth</i>	Dessiccation. Formol de 2 à 5 secondes.	Solution aqueuse de violet de gentiane à 10 o/o. On peut aussi faire un Gram.	Sérum ou liquide d'ascite.
<i>Buerger</i> (voir détails p. 112).	Solut. de Zenker sans acide acétique.	Coloration par solution dans de l'eau d'aniline de violet de gentiane ou de fuchsine.	Sérum ou liquide d'ascite. La solution fixatrice étant saturée en sublimé, on enlève l'excès par des lavages successifs à l'iode et à l'alcool à 95 degrés.
<i>Epstein</i>	Sol. bichromatée à 25 o/o.	Liquide de Ziehl.	Mélange à parties égales d'eau de source et d'ovalbumine.
<i>Huntoon</i>	Dessiccation. Solution fixatrice et colorante à base d'acide phénique, d'acide lactique, d'acide acétique et de fuchsine.		Petit lait ou sol. de caséinate de soude.

La coloration du fond

La plupart des méthodes employant une albumine laissent sur la préparation un fond albumineux plus ou moins coloré. Ce point doit nous retenir un instant.

Le fond peut être parfois coloré intensément et la capsule incolore (par exemple dans les méthodes de Hamm et de Weidenreich). Mais il intervient ici un autre phénomène. Si on examine attentivement les préparations faites par ces méthodes, on s'aperçoit, qu'autour des grains de colorant et des débris quelconques non microbiens que l'on rencontre parfois, il se forme aussi une auréole incolore analogue à

celle qui entoure les germes. Si l'on opère de la même façon avec des germes non capsulés, du *Proteus* ou du *Bacille typhique* par exemple, on obtient les mêmes résultats. Aussi Hamm conclut-il que toutes les bactéries possèdent une capsule. Or notre méthode à l'encre de Chine nous a montré (résultat qui confirme l'opinion classique) que les germes tels que le *Proteus* et le *B. typhique* ne possèdent pas de capsules. Les images obtenues par les méthodes de Hamm et de Weidenreich sont donc dues à des artifices et les prétendues capsules sont des zones de rétraction du fond de la préparation.

Nous pensons que les germes créent sur le fond albumineux de petites solutions de continuité qui s'accroissent sous forme de larges auréoles par la dessiccation et par la fixation osmique ; nous verrons en effet qu'une fixation par un autre agent que l'acide osmique, ne produit pas de telles zones de rétraction. Si l'on veut user d'une image qui nous permettra de mieux concrétiser la formation de ces auréoles il faut comparer l'action des germes sur le fond albumineux en train de se dessécher, à celle de petits coups d'épingle sur une membrane de caoutchouc tendue.

La méthode imaginée par Boni, dans laquelle le support albumineux est constitué par un mélange d'ovalbumine, de glycérine et de formol accentue encore la formation de telles pseudo-capsules. Boni ainsi que Hamm trouve des capsules autour de tous les germes, et même autour des grains de colorants.

Notons en passant que c'est une erreur courante d'interpréter comme capsule dans l'examen d'un crachat, l'auréole incolore qui entoure souvent le pneumocoque. Nous avons là précisément un liquide albumineux et il se passe le même phénomène que plus haut. La prétendue capsule n'est qu'une zone de rétraction. Il suffit, d'ailleurs, d'examiner la préparation pour trouver de telles auréoles autour de germes n'ayant ni l'aspect, ni les réactions colorées des germes encapsulés.

Les méthodes de Hiss, Hamm, Médalia, Boni, Welch, Weidenreich, Wadsworth, Epstein et Hulton sont donc à rejeter.

Il nous reste maintenant à examiner les méthodes de Buerger, de Rosenow et de Smith. Cette dernière n'est qu'une variante de celle de Rosenow (emploi d'acide phosphomolybdique au lieu de tanin pour précipiter l'albumine) et donne des résultats inférieurs.

Nous nous en tiendrons donc aux méthodes de Buerger (1) et de Rosenow (2).

1. Buerger, *Nouvelle méthode de coloration des capsules microbiennes, avec contribution à l'étude de la morphologie et de la différenciation des organismes capsulés*. Mount Sinai Hospital Reports, 1907.

L'auteur utilise : 1° Sérum bovin ou humain étendu d'eau physiologique à parties égales, ou liquide d'ascite, ou liquide pleural ; 2° fixateur : Bichromate de potasse, 2 gr. 50 ; sulfate de soude, 1 gramme ; eau, 100 grammes ; saturer la solution avec du sublimé ; 3° alcool à 80-95° ; 4° teinture d'iode à 7 0/0 ; 5° solution colorante fraîchement préparée : mélanger 10 centimètres cubes d'huile d'aniline et 100 centimètres cubes d'eau, agiter, filtrer, ajouter 5 centimètres cubes de solution alcoolique

Etude particulière des méthodes de Buerger et de Rosenow

Ce sont là deux bonnes méthodes.

Elles diffèrent l'une de l'autre en ce que la première élimine le fond albumineux de la préparation et que la seconde le retient. Toutes les deux évitent la dessiccation et le chauffage qui altèrent le plus la morphologie capsulaire. Le support albumineux est le même : c'est soit du sérum humain ou animal étendu de son volume d'eau physiologique, soit du liquide d'ascite. Le fixateur est dans les deux cas

saturée de violet de gentiane ; 6° solution aqueuse de Cl Na à 2 0/0 ; 7° des cultures sur milieu de Löffler, sur gélose-ascite ou gélose-sérum.

On mélange sur une lame bien nettoyée une parcelle de culture et une goutte de sérum, puis on étale en couche mince. Avant dessiccation complète, on ajoute le fixateur et chauffe légèrement pendant trois secondes. On lave rapidement à l'eau courante, puis à l'alcool. On fait agir la teinture d'iode une minute, puis l'élimine par plusieurs lavages à l'alcool et on sèche à l'air. On colore trois secondes au violet, lave et monte dans la solution salée.

2. Rosenow, *J. of. Am. Med. Ass.*, 1911, t. LVI, p. 418 et *J. of. Inf. Dis.*, 1911, t. IX, p. 1 :

On mélange sur lame propre une goutte de culture et une goutte de sérum étendu de son volume d'eau ou de liquide d'ascite. On étale en frottis très fin. Alors que les bords de la préparation commencent à sécher, elle est convertie avec une solution de tanin à 5 ou 10 0/0 pendant dix à vingt secondes. Elle est ensuite lavée dans l'eau et séchée. On colore par le violet de gentiane aniliné une demie ou une minute en chauffant doucement. On lave à nouveau à l'eau puis on traite par la solution de Lugol une demie minute. On décolore à l'alcool à 95 degrés, on lave à l'eau et colore par une solution d'éosine dans l'alcool. On lave à l'eau, on sèche et on monte au baume.

un fixateur d'albuminoïdes. *Il ne fixera donc pas la capsule qui est un produit de nature hydrocarbonée.*

Dans la méthode de Rosenow, le fixateur est une solution tannique ; dans celle de Buerger, c'est le liquide de Zenker sans acide acétique. La coloration se fait par la méthode de Gram (méthode de Rosenow) en faisant agir le violet de gentiane à chaud, ou par une solution de violet de gentiane dans l'eau d'aniline (méthode de Buerger). Mais, en outre, Buerger élimine le fond de la préparation. Pour ce faire, il fixe très légèrement, sans laisser le liquide agir plus de trois secondes. Puis il lave à l'eau, ce qui enlève le fond, et élimine l'excès de sublimé par un lavage à la teinture d'iode et à l'alcool.

Quels sont les résultats obtenus par ces deux méthodes ? La technique de Rosenow est d'exécution facile et permet l'obtention de jolies préparations. Le microbe apparaît fortement coloré en violet ou en rouge, suivant sa réaction à la coloration de Gram, et est entouré d'une grosse capsule rose, délimitée du fond albumineux par une ligne plus ou moins nette suivant les cas.

Rosenow trouve de peu d'importance, la présence ou l'absence du fond albumineux, car il dit que lorsqu'on a affaire à un germe capsulé la substance capsulaire totale est colorée par sa méthode, et lorsqu'il y a une zone vide et non colorée c'est qu'on est en présence d'une zone de rétraction. Cela est vrai. Mais il y a une objection déjà faite à la méthode

par Baehr et Kantor (1) et qui est la suivante : quand la zone de rétraction est très étroite, le bord coloré du fond albumineux enveloppe si étroitement les organismes qu'il simule une capsule. On n'arrive pas à discerner si la zone est colorée ou non.

En résumé, la méthode de Rosenow, d'une exécution facile est excellente lorsqu'il s'agit de mettre en évidence des capsules microbiennes fortement développées telles que celles du pneumobacille ou du pneumocoque III. Mais lorsqu'on a affaire à des capsules minces, il est difficile de conclure.

La méthode de Buerger est par contre d'une exécution beaucoup plus délicate. Son auteur recommande de nombreuses précautions. Pour que l'on puisse éliminer le fond de la préparation il faut une fixation très rapide et c'est là le temps délicat de la technique. Effectivement, on ne réussit les préparations qu'après de multiples essais et lorsqu'on possède bien la technique en mains. Les résultats que l'on obtient sont alors excellents. Le fond albumineux étant disparu ou réduit à un fin substratum granuleux à peine coloré, fait nettement ressortir les capsules roses, larges et régulières autour des corps microbiens. L'absence de fond élimine l'hypothèse de zones de rétraction, et l'on voit sans la moindre ambiguïté une aire colorée autour des corps microbiens. Notons cependant la présence à la périphérie de la capsule d'une ligne d'épaisseur variable

1. Baehr et Kantor, *Centr. f. Bakt.*, 6 avril 1912.

et colorée plus ou moins intensément. Cette ligne était moins nette, dans la méthode de Rosenow.

Voilà exposées, les deux méthodes qui nous donnent les meilleurs résultats. Ceux-ci sont-ils constants ?

Nous avons déjà signalé plus haut l'inconvénient que présente la méthode de Rosenow lorsqu'il s'agit de colorer des capsules peu développées et l'erreur possible en présence de germes peu capsulés. Nous avons indiqué d'autre part que la méthode de Buerger était d'une exécution délicate.

Mais ce ne sont pas là les seuls inconvénients de ces méthodes.

Nous avons vu au cours de ce travail (voir, chapitre I^{er}, p. 47) que la présence de la capsule chez les pneumocoques est loin d'être un caractère constant ; si on la trouve toujours chez les pneumocoques du type III, elle peut faire défaut chez les races I ou II, *même in vivo*. L'examen à l'encre de Chine nous a montré chez les pneumocoques la présence d'un corps microbien central et d'une membrane cellulaire que nous avons signalée comme étant généralement très épaisse. Or cette membrane n'est pas colorable par les colorants usuels ; seul le corps microbien prend le Gram. On conçoit alors que la présence de cette membrane puisse dans les préparations prêter à confusion avec une capsule faiblement développée. Nous avons d'ailleurs, par la méthode de Buerger ou par celle de Rosenow pu mettre en évidence des capsules autour de germes que la

méthode à l'encre de Chine nous montrait comme en étant dépourvus ; et l'examen comparé de deux préparations (l'une fraîche : encre de Chine, l'autre colorée : Buerger ou Rosenow) nous montrait une correspondance morphologique d'une part entre le corps microbien noir de l'encre de Chine et la partie centrale ayant pris le Gram du Buerger, d'autre part, entre la membrane cellulaire de l'encre de Chine et la capsule de la préparation colorée. C'est ce que Buerger et Rosenow appellent une capsule « pauvrement développée ». A l'encontre de Libmann (1) nous ne croyons pas à l'infailibilité de la méthode de Buerger pour le diagnostic rapide des infections à pneumocoques, puisqu'elle prête à confondre membrane cellulaire avec capsule faiblement développée.

Là ne se borne pas l'inconvénient de ces méthodes.

Nous avons eu l'occasion de signaler dans ce travail (voir chap. I^{er}, p. 39) le polymorphisme des capsules du pneumobacille et du pneumocoque. Si nous prenons une culture de pneumobacille âgée de quarante-huit heures, c'est-à-dire très riche en capsules déformées et que nous appliquions la méthode de Buerger ou celle de Rosenow, il nous est impossible de mettre en évidence les formes amiboïdes plasmodiques ou en panaches. La préparation ne montre que des corps microbiens entourés de filaments colorés en rose, et quelques diplocoques encapsulés

1. Baehr et Kantor, *Centr. f. Bakt.*, 6 avril 1912. Discussion de la communication.

correspondant aux rares germes à capsules régulières existant dans la culture. Tous les auteurs qui se sont occupés de la question, ont méconnu ces formes anormales. Ils opéraient vraisemblablement avec des cultures jeunes, seuls cas où il y a possibilité avec ces méthodes de mettre en évidence de jolies capsules.

Pour expliquer ces anomalies et ces échecs il est nécessaire de pénétrer le mécanisme intime de la coloration de la substance capsulaire au moyen des méthodes à albumine.

Pourquoi les méthodes utilisant une albumine semblent elles colorer les capsules ?

Dans l'étude des méthodes n'employant pas d'albumine, nous avons démontré que la substance capsulaire n'était pas colorable. Les essais en ce sens, sur des germes à l'état frais échouent par quelque colorant que ce soit. Les fixateurs sont inopérants ou nuisibles. Nous avons attribué ce dernier fait à la faible teneur (8 o/o) de la substance capsulaire en produits colorables, c'est-à-dire en gomme.

Or les méthodes utilisant l'albumine permettent de mettre en évidence autour de chaque corps microbien une substance colorée ayant la même forme que la capsule examinée à l'état frais.

L'explication suivante confirmée par les faits nous paraît la plus vraisemblable.

Il est indéniable que la substance capsulaire elle-même, n'est pas fixée par les fixateurs utilisés (acide osmique, sublimé, tanin, bichromate de potasse, etc.). Ce qui est fixé c'est l'albumine elle-même.

Voici comment les choses se passent :

Avant d'étaler la préparation, on mélange intimement une goutte de culture avec une goutte d'un sérum quelconque, ou de liquide d'ascite. Les capsules sont ainsi enrobées dans un liquide visqueux.

Lorsqu'on fixe la préparation, l'albumine est précipitée autour de la capsule. Il se forme ainsi une poche dans laquelle est englobé un germe et sa capsule. Quand on dessèche la préparation par la chaleur après fixation, la couche d'albumine précipitée autour de la capsule aura tendance à éclater sous la pression de la vapeur fournie par l'eau de la capsule. Si la fixation est convenable, si la dessiccation n'est pas brutale (avantage de la dessiccation à la température ordinaire) la capsule demeure inaltérée, car l'enveloppe d'albumine ne cède pas. Si au contraire on dessèche de façon un peu brutale (sur une veilleuse de bec Bunsen p. ex.) la couche d'albumine éclate en un point, l'eau de la capsule s'évapore, le galactane se dessèche à l'intérieur et forme les filaments que l'on voit assez fréquemment dans les préparations faites suivant les procédés de Buerger ou de Rosenow. Notons en outre que la fixation à l'acide osmique semble rendre encore plus fragile la couche d'albumine.

Ce que l'on voit finalement, ce n'est pas la subs-

tance capsulaire, mais l'albumine qui l'entoure et c'est pourquoi la coloration se fait si facilement au moyen de ces méthodes, alors qu'elle échoue avec les procédés n'utilisant pas d'albumine.

On comprend alors pourquoi dessiccation et chaleur sont moins nocives en présence d'albumine. Par ces moyens celle-ci se dépose ou se coagule autour des germes de sorte qu'il y a bien un début de dessiccation et de rétraction de la capsule, mais la coagulation de l'albumine se fait assez rapidement pour éviter une dessiccation plus avancée. C'est pourquoi les capsules, malgré le procédé brutal employé pour la fixation, sont moins altérées que dans les méthodes sans albumine. Le témoin de l'altération réside dans la présence à la périphérie de la capsule d'une ligne épaisse, colorée, qui est du galactane déposé dès le début de la dessiccation. Notons cependant que les images obtenue sont malgré tout, nettement moins jolies est moins grosses que par les méthodes de Rosenow ou de Buerger, ou par l'encre de Chine.

Au moyen de cette explication, on comprend pourquoi les méthodes étudiées sont impuissantes à mettre en évidence les capsules déformées que nous avons signalées dans les cultures de quarante-huit heures. Tant que la capsule était petite, et circonscrite à une zone de forme ovulaire, l'enrobage par l'albumine était facile et le coagulum formé était homogène et compact. Lorsqu'il s'agit d'enrober toute une plage capsulaire ou des filaments gommeux, la surface est trop étendue ou trop découpée, et la

nappe d'albumine fixée et desséchée ne demeure pas homogène, unie. Elle se fendille et éclate par endroits, et la coloration consécutive ne fournit que des images altérées et rétractées. On retrouve alors les nombreux filaments colorés, indice de la destruction de la capsule.

D'autres faits plaident encore en faveur de notre opinion.

Il est un fait d'observation connu et relaté par tous les livres classiques de bactériologie, c'est que lorsqu'il s'agit d'un exsudat albumineux, d'un sang infecté, d'un liquide de péritonite, une méthode de coloration simple telle que le Gram, ou même simplement le bleu de méthylène, montre une capsule autour des pneumocoques ou des pneumobacilles. Cela tient à ce que le milieu est albumineux et que nous retombons dans les méthodes du deuxième groupe. C'est d'ailleurs de cette façon que les capsules ont été mises en évidence. On obtient les mêmes résultats si l'on s'adresse à une culture en sérum de lapin.

Prenons une culture de pneumobacille en bouillon Martin glucosé. Si nous faisons une préparation par une méthode sans albumine, on observe seulement les corps microbiens entourés de filaments de galactane colorés. Dans un tube à essai additionnons un volume de culture d'un volume de sérum et portons le tout, pendant vingt minutes au bain-marie à 65 degrés, c'est-à-dire à une température à laquelle le sérum ne soit pas encore coagulé, mais

seulement visqueux. A ce moment il y a agglomération des particules albuminoïdes autour des capsules. On fait alors un étalement que l'on colore. La préparation montre de belles capsules. Cela indique combien leur mise en évidence est liée à la présence de sérum.

Lorsque nous avons étudié les méthodes sans albumine nous avons bien spécifié que nous faisons une étude portant uniquement sur des cultures liquides en bouillons non albumineux. En vérité ces méthodes donnent elles aussi, d'assez bons résultats lorsqu'on les applique à la recherche des capsules dans le sang des animaux, dans leurs exsudats pathologiques, ou dans les cultures en bouillon-sérum. Il est vraisemblable que leurs auteurs cherchaient surtout à voir les capsules dans de tels milieux, devant l'impossibilité de les mettre en évidence dans les autres. C'est là-dessus qu'était fondée la notion jusqu'alors classique de l'absence des capsules dans les milieux dépourvus d'albumine. Nous savons maintenant ce qu'il faut en penser.

Métachromasie de la capsule

Il semble assez paradoxal qu'après une discussion nous amenant à conclure à la non-colorabilité de la capsule, l'on puisse parler de sa métachromasie.

En vérité, nous parlons de la métachromasie de la capsule, en faisant les mêmes réserves que lorsque

nous avons parlé de sa coloration. Dans les 2 cas le sérum intervient pour une large part.

Qu'est-ce que la métachromasie ?

D'après Ehrlich, pour qu'il y ait métachromasie, il faut qu'un colorant chimique défini colore divers éléments histologiques en teintes différentes. Ainsi la thionine colore en bleu presque tous les éléments d'une préparation et en rouge les granulations des labrocytes et le mucus. La métachromasie est donc le virage de certaines matières colorantes au contact d'éléments particuliers.

Les principaux colorants métachromatiques sont : le violet de méthyle, le dahlia, la thionine, le bleu de toluidine, le violet de méthylène, le crésyl violet RR, la safranine.

La métachromasie de la capsule est facile à observer. Il suffit pour cela de prendre une culture de pneumobacille ou de pneumocoque en sérum de lapin et d'en étaler une goutte sur lame. On dessèche la préparation à l'air, puis on y verse une solution hydro-alcoolique de bleu de toluidine. L'examen microscopique montre alors un corps microbien fortement coloré, entouré d'une large capsule mauve. Comment expliquer ce phénomène de métachromasie ?

Michaelis considère la métachromasie comme une modification tautomère des sels colorants. Ce serait quelque chose d'analogue aux changements de coloration que certains corps tels que l'iode présentent au contact de différents solvants comme l'alcool et le

chloroforme. Cette hypothèse ne rend cependant pas compte de tous les faits; aussi Hansen a-t-il proposé une autre interprétation basée sur les phénomènes d'hydrolyse. Par suite de cette hydrolyse, les solutions aqueuses des colorants sont dissociées, et renferment des molécules de base libres. Ainsi la coloration métachromatique résulterait de ce que certains éléments prennent la couleur de la base libre préexistant dans le liquide.

Dans le cas du pneumobacille de Friedlænder il est nécessaire de remarquer que les capsules métachromatiques ne s'observent qu'en présence de sérum. L'observation de cette métachromasie amena Heim à penser que les capsules étaient formées de mucine. Nous savons maintenant qu'elles sont composées de galactane.

Le problème qui se pose est alors le suivant. La métachromasie est-elle due à la substance capsulaire? Est-elle due au sérum? Est-elle due à la superposition du sérum à la capsule?

Et tout d'abord, *la métachromasie est elle due à la substance capsulaire? Non.* Plusieurs observations nous le prouvent.

La première, c'est que les préparations à l'état frais par la méthode à l'encre de Chine, après addition d'une goutte de solution d'un colorant métachromatique à l'encre, montrent un corps microbien noir, mais une capsule toujours incolore. Or, dans les préparations métachromatiques, la capsule est intacte et, puisqu'elle ne prend pas les colorants à

l'état frais, il n'y a logiquement aucune raison pour qu'elle les prenne, sous le même état, mais en présence de sérum.

Nous pouvons aller plus loin. Si on étale sur lame un grattage d'une culture de pneumobacille sur gélose, fixe à la chaleur et colore avec les colorants métachromatiques, on voit au microscope, des corps microbiens ayant pris fortement la couleur fondamentale, et les débris de la substance capsulaire colorés aussi de la même façon quoique moins intensément, sans que l'on perçoive la moindre métachromasie. Donc la substance capsulaire, même débarrassée de son eau n'est pas métachromatique.

La métachromasie est-elle due au sérum seul ?
Non. Parmi les albuminoïdes il n'y a guère que la mucine qui soit métachromatique. Un étalement de sérum sur lame, coloré avec le bleu de toluidine, le dahlia, le violet de méthylène, etc... ne montre aucune métachromasie.

La seule conclusion qui s'impose est l'hypothèse d'une *métachromasie due à l'ensemble sérum + substance capsulaire.*

CONCLUSIONS

Nos conclusions sont les suivantes, ordonnées chapitre par chapitre.

CHAPITRE PREMIER

1° Pour examiner la capsule du pneumobacille de Friedlænder, il faut la mettre à l'abri de toute dessiccation.

2° L'examen classique par la méthode à l'encre de Chine telle qu'on la pratique couramment, ne montre pas la capsule véritable, mais seulement un corps microbien noir entouré d'une enveloppe très réfringente constituée par la membrane cellulaire et par le résidu d'évaporation de la substance capsulaire.

3° La seule méthode qui montre les capsules à leur état naturel sans leur faire subir la moindre altération est celle que nous avons décrite au cours de ce travail, et qui ne comporte ni dessiccation, ni fixation.

4° L'emploi de cette méthode permet de mettre les capsules du pneumobacille en évidence dans tous les milieux (*in vivo* comme *in vitro*).

5° La substance capsulaire du pneumobacille ne semble pas limitée par une membrane.

6° Il est aisé d'appliquer notre méthode à l'étude des germes encapsulés. Cette étude présente un grand intérêt pour les pneumocoques, car elle montre que leur capsule ne constitue pas un caractère fondamental. On doit cependant noter sa présence constante et son volume considérable chez les pneumocoques du type III.

CHAPITRE II

1° La substance capsulaire du pneumobacille de Friedlænder contient environ 8 o/o de galactane et 92 o/o d'eau.

2° Elle est soluble dans l'eau mais insoluble dans les solutions de gélose à 0,15 pour mille.

3° Par voie chimique (macération dans l'eau, chauffage avec les acides ou les alcalis dilués) il est possible de séparer la capsule du corps microbien. Par voie biologique (repiquages successifs sur milieux artificiels) on peut obtenir des races non encapsulées.

4° La décapsulation des germes par macération aqueuse ne semble pas altérer leur vitalité ni leur virulence.

CHAPITRE III

La genèse des capsules est un cas particulier de la production des gommes par les bactéries.

CHAPITRE IV

1° Les méthodes de coloration des capsules n'employant pas d'albumine sont entachées d'erreurs. Si elles peuvent donner et de façon inconstante, quelques bons résultats avec les exsudats pathologiques ou les cultures en milieux-sérum (et dans ce cas on en revient aux méthodes utilisant une albumine) elles ne montrent jamais de capsules dans les milieux liquides ordinaires.

2° Les méthodes utilisant un produit albumineux sont un peu meilleures, et parmi elles, celles de Rosenow et de Buerger. Elles altèrent malgré tout la capsule et sont impuissantes à montrer les formes anormales et peu développées, et peuvent prêter à confusion en présence de germes de petites dimensions.

3° Les méthodes utilisant une albumine ne colorent pas la capsule, mais le produit albumineux qui l'entoure.

4° La métachromasie des capsules n'est due ni à la substance capsulaire seule, ni au sérum seul, mais à l'ensemble sérum + substance capsulaire.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse.

M. RADAIS

Vu :
Le Doyen de la Faculté,

M. RADAIS

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,

APPELL

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Le lecteur trouvera ici l'indication bibliographique des techniques étudiées au chapitre IV et qu'il eut été difficile, vu leur nombre, d'introduire dans le texte lui-même.

Nous mentionnons de plus toute une série de travaux que nous avons consultés avec fruit et dont l'indication peut être de quelque utilité à ceux que la question intéresse.

TECHNIQUES

- Johne.* — Manuel technique de Microbiologie et Sérologie, 1925, Calmette, Nègre, Boquet.
- Klett.* — Manuel technique de Microbiologie et Sérologie, 1925, Calmette, Nègre, Boquet.
- Friedländer.* — Mikroskopische Technik, 1885, p. 57.
- Rosenow.* — J. A. M. A., 1911, LVI, p. 418 ; J. Inf. Dis., 1911, IX, p. 1.
- Medalia.* — J. A. M. A., 1911, LVI, p. 1189.
- Guarnieri.* — Atti d. Accad. Med. d. Roma, 1888, Ser. II, 4, p. 114.
- Hiss.* — J. Exp. Med., 1902, VI, p. 317 ; J. Exp. Med., 1905, VII, p. 547.
- Boni.* — Recerche Sulla capsula dei Bacteri (Giornale d. Soc. Ital d'Igiene, XXIII, 1901, p. 417) ; Centr. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 28, 1900, p. 705.
- Smith.* — Boston Med. and Surgeon Journal, 1902, 147, p. 659.
- Ribbert.* — Zur farbung der Pneumoniekokken (Deutsche Med. Wochenschrift, 1885, n° 9, p. 136).
- Conkey (Mac).* — The lancet, 1898, p. 1262.
- Welch.* — Johns Hopkins Hosp. Bull. 1892, XIII, p. 125.
- Hamm.* — Centr. f. Bakt., 1907, Orig. XLIII, p. 287.
- Weidenreich.* — Centr. f. Bakt., 6 avril 1912.
- Wadsworth.* — J. Inf. Dis., 1906, 111, p. 610.
- Matteo Carpano.* — Centr. f. Bakt., I, Orig., 1913, Bd. 70, p. 42.
- Buerger.* — Mount Sinai Hosp. Rep., 1907 ; Journal Inf. Dis., vol. 4, 1907, p. 426 ; C. f. B. Abt. I. Orig. Bd. 39, 1905, p. 216, 335.

- Cornil et Alvarez*. — Arch. de phys. norm. et path., 1885.
Thost. — Deutsche Med. Wochenschrift, 1886, p. 161.
Paltauf et Eiselsberg. — Zur etiologie des Rhinoskleroms.
Fortscher. d. Med., 1886, n° 19 et 20.
Hardouin. — Comptes rendus de la Société de Biologie (Séance
du 24 février 1912, t. LXXII, p. 298).
Kayser. — C. f. B. Abt. I. Orig. Bd. 41, 1906, p. 138.
Epstein. — New-York Society, vol. V, 1905, p. 4.
Huntoon. — Journal of Bact., t. II, p. 241.
Riemsdijk (Van). — C. f. B., t. LXXXVI, 1921, p. 177.
Malone. — Ind. Jour. of Med Res., t. IX, avril 1922, p. 804.
Richard Mins. — Journ. of Pathol. and Bact., t. XX, janvier
1916, p. 257.
Legroux (R.). — Ann. I. Pasteur, t. XXXIX, avril 1925, n° 4.

LECTURES COMPLÉMENTAIRES

- Bach (F.-W.)*. — Zur färberischen Darstellung der Kapselbakterien (Cent. f. Bakt. Orig. I. Abt., t. 88, 1922, p. 510).
Buerger (L.). — A method for making permanent mounts of specimens stained by Welch's capsule method (J. Am. of Med. Ass., 13 mai 1905).
Carageorgiadès. — Milieu de culture électif pour microbes encapsulés (C. R. de la S. de Biol., 1915, t. 78, p. 677).
Cramer. — Die Zusammensetzung der Bakterien (Arch. f. Hyg., 1893, p. 151).
Epstein. — On the use of egg albumin in the technic of staining the capsules of Bacteria (The Med. News., 16 déc. 1905).
Kramar (E.). — Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der Kapselsubstanz einiger Kapselbakterien (Cent. f. Bakt., I, T. LXXXVII, 1922, p. 401).
Lanner (E.) und Schœnsleben. — Beiträge zur Kapselfrage beim *Micrococcus tetragenus* (Arch. f. Hyg., XCI, 12 février 1923, p. 349).
Marshall Ward. — The ginger beer plant and the organisms composing it (Philosophical Transact. Royal Soc. London, CLXXXIII, 1892).
Mayer (K.). — Die bedeutung der Kapsel für die Virulenz der *Sarcina tetragena* (Arch. f. Hyg., XCI, 1^{re} août 1922, p. 209).
Ottolenghi. — La capsule du charbon (Zeitschrift f. Immunitätsforsch. Orig. Bd 12, 1912, p. 386).
Plasaj (S.). — Ueber d. Wesen der Bakterienkapseln (Centr. f. Bakt. Orig. XCI, 25 mars 1924, p. 353).

- Smit (J.)*. — Kapselbildung bei Dextranlaktococcen (*Folia microbiologica*, t. V, déc. 1917, p. 41).
- Stapp (C.)*. — Ueber die Reserveinhaltsstoffe und den Schleim von *Azotobacter chroococcum* (*Centr. f. Bakt.*, 2 Abt., t. 61, p. 276, 1924).
- Tænniessen*. — Nouvelle méthode d'extraction des nucléides des corps microbiens (*Centr. f. Bakt. Orig.*, 1921, t. 85, p. 379).
- Van der Elst*. — Procédé général pratique de mise en évidence des corps microbiens (*Centr. f. Bakt. Ref.*, t. 59, 1913, p. 52).
- Van Riemsdijk*. — Die Kapseln der Bakterien und eine neue Methode, diese einfach darzustellen (*Centr. f. Bakt. Orig.*, LXXXVI, 11 mai 1921, p. 177).
- Wreschner (H.)*. — Untersuchungen über die Biologische Bedeutung der Kapsel beim *Micrococcus tetragenes* (*Zeitsch. f. Hyg.*, TXCIII, f. 1, 28 juillet 1921, p. 74).

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE PREMIER. — <i>Présence de la capsule du pneumobacille de Friedländer dans tous les milieux. Nouvelle méthode d'examen des capsules microbiennes.</i>	11
Comment définir une capsule microbienne.....	11
Etude des techniques à employer pour mettre la capsule en évidence.....	18
Critique et modification du procédé à l'encre de Chine.	22
Morphologie du pneumobacille de Friedländer examiné par la méthode à l'encre de Chine modifiée.....	29
Technique définitive.....	33
Application de la méthode à l'examen du pneumobacille dans les différents milieux.....	36
Polymorphisme de la capsule. Membrane péri-capsulaire.....	39
Application de la méthode à l'étude de quelques germes « encapsulés ».....	44
a) Bactéridie charbonneuse.....	44
b) Micrococcus tétragènes.....	45
c) Leuconostoc mésenteroides.....	45
d) Pneumocoques.....	47
CHAPITRE II. — 1 ^{re} Partie : <i>Composition chimique de la capsule du pneumobacille de Friedländer.</i>	55
Analyse de la capsule. Recherches de Tœnniessen et recherches personnelles.....	57
a) Principe.....	57
b) Technique.....	57
c) Identification du produit obtenu.....	59
d) Teneur en eau de la substance capsulaire.....	61
Remarques.....	62
Recherches de Hamm.....	63
a) Technique.....	63

b) Critique.....	64
2° Partie : <i>Recherches complémentaires sur la capsule</i>	66
Décapsulation du pneumobacille.....	66
a) Par voie chimique.....	66
b) Par voie biologique.....	69
Les capsules dans les cultures anaérobies.....	71
Vitalité du pneumobacille dépourvu de capsule.....	72
Virulence comparée du pneumobacille capsulé et décap-	
sulé.....	73
CHAPITRE III. — <i>Historique des travaux sur les gommes mi-</i>	
<i>crobiennes</i>	76
<i>Etude chimique des produits gommeux fournis par les</i>	
<i>différents germes</i>	79
a) Produit visqueux azotés	80
b) Produits visqueux non azotés.....	82
Origine morphologique des gommes microbiennes.....	88
CHAPITRE IV. — <i>Etude des procédés de coloration des cap-</i>	
<i>sules microbiennes</i>	95
INTRODUCTION.....	95
Méthodes n'utilisant pas d'albumine.....	96
Fixation des capsules dans les méthodes n'utilisant	
pas d'albumine.....	97
La coloration de la substance capsulaire.....	102
Méthodes utilisant une albumine.....	105
Fixation de la capsule dans les méthodes utilisant	
une albumine.....	106
La coloration du fond.....	109
Etude particulière des méthodes de Buerger et de	
Rosenow.....	112
Pourquoi les méthodes utilisant une albumine sem-	
blent-elles colorer les capsules ?.....	117
Métachromasie de la capsule.....	121
CONCLUSIONS.....	125
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	128
TABLE DES MATIÈRES	131

